



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

RESISTOMA DE COMUNIDADES BACTERIANAS
PROCEDENTES DE CULTIVOS ECOLÓGICOS Y
CONVENCIONALES.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Valls Martí, Marta

Tutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a externo: MORENO TRIGOS, M^a YOLANDA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

RESISTOMA PROCEDENTE DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN CULTIVOS ECOLÓGICOS Y CONVENCIONALES

Resumen

El debate arduo acerca de los cultivos de origen ecológico y sus beneficios frente a los cultivos convencionales sigue en pie hoy en día tras miles de estudios. Es evidente que los cultivos ecológicos proporcionan una menor exposición a residuos tóxicos y disminuyen el impacto ambiental en todas estas parcelas; sin embargo, las siembras convencionales presentan una mayor productividad y menor costo. La controversia llega cuando se atiende a factores como la seguridad alimentaria, sostenibilidad ambiental y salud humana.

Este proyecto forma parte de un diseño más amplio, un proyecto de un programa PROMETEO para grupos de investigación de excelencia. A pesar de que abarca toda la faceta vegetal, el planteamiento incluye asimismo variados análisis de muestras humanas y animales.

En este estudio se analizaron diferentes muestras de lechuga, espinaca, kale y col, provenientes de cultivos tanto convencionales como ecológicos de la región de Valencia, con el objetivo de detectar resistencias a antibióticos de las cepas presentes en los vegetales.

Primeramente se analizará la microbiota presente en las hojas externas de dichas hortalizas. Posteriormente se caracterizará la resistencia de cada una de ellas frente a un conjunto de antibióticos, cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes, antibióticos de la familia de los β -lactámicos. Tras ello, se establecerán sus perfiles de resistencia mediante el método de antibiograma disco-placa, detectándose un 61,2% de aislados con algún indicio de resistencia.

Asimismo, se estudiará la presencia de enzimas β -lactamasas, proteínas presentes en algunas bacterias que han resultado ser la explicación de las principales resistencias a este grupo de antibióticos. Esto se hará con el test de sinergia de doble disco, mediante el cual se detectará la producción de estas enzimas por un agrandamiento en el halo de inhibición cuando se ensayan los antibióticos con amoxicilina, un inhibidor de estas enzimas.

Para finalizar, las colonias se secuenciarán e identificarán mediante secuenciaciones del gen 16s rRNA para establecer un perfil microbiano definido.

Los resultados elucidan el riesgo del consumo de los vegetales en crudo, independientemente de su tipo de cultivo, pues pueden servir de reservorio para microorganismos resistentes. Esto pone en evidencia el gran problema del uso irracional de estos fármacos y sus consecuencias.

Por todo ello, el presente trabajo pretende ser de apoyo en futuros estudios, abarcando algunos de los objetivos de desarrollo sostenible propuestos por las Naciones Unidas, como son el "Hambre cero", "Salud y Bienestar", "Producción y consumo responsables" y "Vida de ecosistemas terrestres" (2, 3, 12 y 15, respectivamente), presentes a lo largo del proyecto apoyando una mejora de las metodologías más sostenibles de producción agrícola, consumo y uso de los antibióticos.

Palabras clave: antibiograma, β -lactámico, BLEE, carbapenemes, cefalosporinas, cultivo ecológico, resistencia a antibióticos.

RESISTOMA PROCEDENT DE COMUNITATS BACTERIANES EN CULTIUS ECOLÒGICS I CONVENCIONALS

Resum

El debat ardu sobre els cultius d'origen ecològic i els seus beneficis davant dels cultius convencionals segueix avui en dia després de milers d'estudis. És evident que els cultius ecològics proporcionen una menor exposició a residus tòxics i disminueixen l'impacte ambiental a totes aquestes parcel·les; no obstant això, les sèmbrs convencionals presenten més productivitat i menor cost. La controvèrsia arriba quan s'atenen factors com la seguretat alimentària, la sostenibilitat ambiental i la salut humana.

Aquest projecte forma part d'un disseny més ampli, un projecte d'un programa PROMETEO per a grups de recerca d'excel·lència. Tot i que abasta tota la faceta vegetal, el plantejament inclou així mateix variades anàlisis de mostres humanes i animals.

En aquest estudi es van analitzar diferents mostres d'encisam, espinac, kale i col, provinents de cultius tant convencionals com ecològics de la regió de València, amb l'objectiu de detectar resistències a antibiòtics dels ceps presents als vegetals.

Primerament s'analitzarà la microbiota present a les fulles externes d'aquestes hortalisses. Posteriorment es caracteritzarà la resistència de cadascuna davant d'un conjunt d'antibiòtics, cefalosporines de tercera generació i carbapenems, antibiòtics de la família dels β -lactàmics. Després d'això, se n'establiran els perfils de resistència mitjançant el mètode d'antibiograma disco-placa i es detectarà un 61,2% d'aïllats amb algun índex de resistència.

Així mateix, s'estudiarà la presència d'enzims β -lactamases, proteïnes presents en alguns bacteris que han resultat ser l'explicació de les resistències principals a aquest grup d'antibiòtics. Això es farà amb el test de sinergia de doble disc, mitjançant el qual es detectarà la producció d'aquests enzims per un engrandiment a l'halo d'inhibició quan s'assagen els antibiòtics amb amoxicil·lina, un inhibidor d'aquests enzims.

Per acabar, les colònies se seqüenciaran i s'identificaran mitjançant seqüenciacions del gen 16S rRNA per establir un perfil microbià definit.

Els resultats eluciden el risc del consum dels vegetals en cru, independentment del tipus de cultiu, ja que poden servir de reservori per a microorganismes resistents. Això evidencia el gran problema de l'ús irracional d'aquests fàrmacs i les seves conseqüències.

Per tot això, aquest treball pretén ser de suport en futurs estudis, abastant alguns dels objectius de desenvolupament sostenible proposats per les Nacions Unides, com són la "Hambre cero", "Salud y Bienestar", "Producción y consumo responsables" y "Vida de ecosistemas terrestres" (2, 3, 12 y 15, respectivament), presents al llarg del projecte donant suport a una millora de les metodologies més sostenibles de producció agrícola, consum i ús dels antibiòtics.

Paraules clau: *antibiograma, β -lactàmic, BLEE, carbapenems, cefalosporines, cultiu ecològic, resistència a antibiòtics.* .

RESISTOME FROM BACTERIAL COMMUNITIES IN ECOLOGICAL AND CONVENTIONAL CULTURES

Abstract

The arduous debate about the cultivars of ecological origin and their benefits ahead of conventional cultivars continues today after thousands of studies. It is evident that ecological crops provide less exposure to toxic residues and reduce the environmental impact of all these parcels. However, conventional crops present more productivity and lower cost. The above controversy concerns factors such as food safety, environmental sustainability and human health.

This project is part of a larger design, a project of a PROMETEO program for research groups of excellence. While covering the whole plant side, the approach also includes a variety of analyses of human and animal samples.

In this study different samples will be analysed, including lettuce, spinach, kale and cabbage, coming from both conventional and ecological crops of the Valencia region, with the objective of detecting resistance to antibiotics of the ceps present in the vegetables.

Firstly, the microbiota present in the external leaves of these vegetables will be analysed. Subsequently, the resistance of each one will be characterized by a set of antibiotics, third-generation cephalosporins and carbapenems, antibiotics from the β -lactam family. Afterwards, the resistance profiles will be established together with the disc-plaque antibiogram method, where 61.2% of the isolates with some indication of resistance were detected.

In addition, the presence of β -lactamase enzymes, proteins present in some bacteria that have turned out to be the explanation of the main resistances to this group of antibiotics, will be studied. This will be executed with the double disc synergy test, by means of which will detect the production of these enzymes for an enhancement to the inhibition halo when the antibiotics are tested with amoxicillin, an inhibitor of these enzymes .

Finally, the colonies will be sequenced and identified by sequencing the 16s rRNA gene to establish a definitive microbiological profile.

The results elucidate the risk of consuming raw vegetables, regardless of the type of cultivation, since they can serve as reservoirs for resistant microorganisms. All results obtained evidences the great problem of the irrational usage of these drugs and its consequences.

In addition, this work intends to be of support in future studies, supplying some of the objectives of sustainable development proposed by the United Nations, such "Hambre cero", "Salud y Bienestar", "Producción y consumo responsables" y "Vida de ecosistemas terrestres" (2, 3, 12 y 15, respectively), present at the end of the project communicating support to a million of the most sustainable methodologies of agricultural production, consumption and use of antibiotics.

Key words: *antibiogram, β -lactam, ESBL, carbapenems, cephalosporins, ecological cultivation, resistance to antibiotics.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin mis tutoras, Ana y Yolanda, ni sin todas mis compañeras de laboratorio en el IIAMA. Con vuestra confianza y paciencia me habéis enseñado mucho a lo largo de estos meses.

Gracias a mis padres y mi hermana, por ser un apoyo incondicional en estos cuatro años de carrera, gracias por creer en mí, incluso cuando yo misma dudaba en si iba a llegar hasta aquí y por regalarme la posibilidad de vivir todas las experiencias de esta etapa que me han aportado tantísimo.

Y por último dar las gracias a las amigas que me ha dado biotecnología, que sin duda es lo mejor que me llevo de Valencia. Tantas horas juntas nos han convertido en algo más que graduadas, en amigas que son casi familia.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 SEGURIDAD ALIMENTARIA Y RIESGO MICROBIOLÓGICO	1
1.2 ANTIBIÓTICOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN	3
1.2.1. Clasificación de antibióticos según el mecanismo de acción	4
1.3 RESISTENCIA ANTIBIÓTICA	6
1.3.1. Mecanismos de resistencia	7
1.3.2. Mecanismos de propagación de resistencias	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS	12
3.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE COLONIAS	13
3.2.1 Cultivo de colonias en Super Carba (SC).....	13
3.2.2 Cultivo de colonias en Plate Count (PCA).....	14
3.3 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	14
3.3.1. Conservación de las cepas.....	16
3.4 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	16
3.4.1 Extracción de DNA.....	16
3.4.2 PCR estándar y electroforesis	16
3.4.3 Secuenciación 16S rRNA	18
4. RESULTADOS	19
4.1 SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS	19
4.1.1. Estudio de producción de BLEE en los aislados	22
4.1.2. Comparativa de perfiles de resistencia entre aislados de origen convencional y ecológico.....	23
4.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS	24
5. DISCUSIÓN	25
5.1 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LOS AISLADOS	25
5.1.1. Estudio de producción de BLEE en los aislados.....	26
5.1.2. Comparativa de perfiles de resistencia entre aislados de origen convencional y ecológico.....	27
5.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS	27

6. CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXO.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de beta-lactámicos Beta-lactam antibiotics (Suarez y Gudiol, 2009).

Figura 2. Frecuencia de los principales 50 subtipos de genes de resistencia a antibióticos, y sus respectivas familias antibióticas de las publicaciones en PubMed de los últimos 30 años (Zhuang et al., 2021).

Figura 3. Crecimiento de colonias de las muestras P31 y P32 en SC.

Figura 4. Esquema de procedimiento de realización y lectura de un antibiograma con el método disco-placa para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos. (Elaborado en Biorender.com)

Figura 5. Alineamiento de las secuencias de los primers de amplificación universal 27F y 1492R y sus regiones objetivo del gen 16S rRNA de *B.subtilis*, *V. fischeri*, y *V. anguillarum* (Polz and Cavanaugh, 1998).

Figura 6. Aislado del gen 16S rRNA en electroforesis con gel de agarosa (1. Marcador λ DNA, 2. Control positivo *E. coli*, 3. Control negativo agua MilliQ, 4. Muestra 1, 5. Muestra 2).

Figura 7. Sensibilidad individual a antimicrobianos de las cepas aisladas.

Figura 8. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de kale.

Figura 9. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de espinacas.

Figura 10. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de lechuga.

Figura 11. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de col.

Figura 12. Presencia o ausencia de BLEE en las muestras según los resultados en CTL y CAL.

Figura 13. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de origen ecológico.

Figura 14. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de origen convencional.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recopilación de muestras analizadas. Tipo de vegetal, abreviatura, nº de muestra y fecha de toma de muestra y análisis.

Tabla 2. Antibióticos β -lactámicos seleccionados para el estudio de sensibilidad

Tabla 3. Enumeración de ciclos para PCR estándar en el termociclador.

Tabla 4. Patrones de resistencia de los cultivos puros

Tabla 5. Identificación molecular de las cepas resistentes aisladas

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de estas últimas décadas se ha popularizado el consumo de productos bajo la etiqueta de ecológicos dado que se perciben por la población de consumidores como alimentos más saludables, respetuosos con el medio ambiente e incluso más sabrosos (Agència Catalana de Seguretat Alimentària, 2021), y es que lo ‘convencional’, término que se ha asentado este último siglo en nuestro vocabulario, suele estar asociado a asunciones implícitas, entre ellas el ser innatamente insostenible, destructiva... (Sumberg y Giller, 2022)

El cultivo ecológico u orgánico queda definido como un sistema de agricultura que mejora la fertilidad del suelo maximizando el uso eficiente de los productos y recursos locales dejando atrás el abuso de agroquímicos, aditivos u otros compuestos sintéticos (Gomiero, 2011). Aunque no solo eso, también se caracteriza por la ausencia de uso de OMG. Para la manutención del bienestar del suelo de cultivo se emplean técnicas como las rotaciones de cultivo o el policultivo, procedimientos considerados la base de la agricultura orgánica (Lampkin, Padel y Foster, 2000).

A escala mundial la producción de este tipo de cultivos está aumentando, puesto que asimismo se considera un instrumento propicio para afrontar algunos de los problemas sociales como la sobrepoblación y el impacto urbano de la misma. Además presenta beneficios económicos mejorando los ingresos para los pequeños proveedores locales y permite una mejora medioambiental en la calidad del suelo, agua, variedad de especies y su bienestar (FAO, 2022).

En cuanto al rango nacional, en España ha incrementado la superficie destinada a plantaciones ecológicas en un 8% durante 2021 frente a los datos de 2020, alcanzando una totalidad de 2.635.442 hectáreas. (Ministerio de Agricultura, P. y A., 2022). Más concretamente, en la Comunidad Valenciana se observa una tendencia al alza muy notable, con un incremento de un 81,2% de las hectáreas empleadas para el cultivo ecológico en cuatro años (2016-2020), y que según la inclinación actual, seguirá aumentando a lo largo de los próximos años. Aspectos como el número de importadores, empresas de carácter agrario y productores han crecido recientemente, así como otros factores de interés como es el volumen de facturación ecológico, aumentando un 21% en tan solo un año; y es que según los datos contrastados, la CV representa un 25% del consumo de productos ecológicos en todo el territorio nacional (CAECV, 2020).

1.1 SEGURIDAD ALIMENTARIA Y RIESGO MICROBIOLÓGICO

A pesar de los beneficios comentados anteriormente, que presentan el cultivo ecológico a nivel socioeconómico, se ha popularizado principalmente por la connotación positiva que esta etiqueta lleva consigo misma, llevando a los consumidores a percibirlos como más seguros y saludables, no siendo esto totalmente cierto en todos los casos.

Según el reglamento descrito por el Parlamento Europeo a cerca de la manufacturación ecológica garantiza la calidad del producto y salvaguarda del ecosistema así como de sus seres vivos (Parlamento Europeo, 2021). No obstante, numerosos estudios han resaltado el hecho de que un producto, en este caso de origen agrícola, sea clasificado como ‘ecológico’ no necesariamente denota mejor salubridad siendo comparados dichos cultivos con los de tipo convencional; pues ambos modos de producción han de seguir un conjunto de normas estandarizadas para garantizar prácticas seguras de higiene y manipulación en cada uno de los estadios por los que pasa el producto hasta su comercialización (Infante y González De Molina, 2013; NFSA, 2014).

Aunque la creciente comprensión de los posibles efectos negativos para la salud por el uso de productos químicos como pesticidas ha derivado en una modificación de la actitud de la población a la hora de optar por productos orgánicos, no se debe olvidar el riesgo de contaminación de origen microbiológico, de la que no se exime ni los productos convencionales. No hace falta indagar mucho para encontrar estudios e informes que confirman que el riesgo microbiológico entre ambos tipos de producción es muy similar, sino mayor en algunos casos en el caso de productos orgánicos, como se ha concluido en estudios como el de Maffei et al. (2016), donde exponen el índice de bacterias patógenas presentes en vegetales de origen orgánico en distintos países, destacando *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* o *S. aureus* en países como Brasil, Noruega, Zambia o Estados Unidos (Maffei et al., 2016) (Ceuppens et al., 2014; Tango et al., 2014; Loncarevic et al., 2005; Mukherjee et al., 2004; Nguz et al., 2005).

La contaminación de los vegetales puede darse en varios niveles de la cadena de producción, desde el crecimiento inicial por el uso de fertilizantes de suelo y agua de riego contaminados, durante la cosecha o en la manufacturación y distribución posterior (Fan, Niemira, et. al, 2009). Los abonos de origen animal son considerados como uno de los reservorios de patógenos más importantes. El uso inadecuado de los mismos en este ámbito supone un alto riesgo para la salud del consumidor (Szczech et al., 2018), ya que su uso en el cultivo orgánico, es mayor que en los cultivos convencionales donde los fertilizantes y otros productos de origen químico son de gran ayuda a la hora de reducir la carga microbiana (Maffei et al., 2016).

En este aspecto, los agentes responsables de las políticas de regulación de todos los tipos de cultivo agrario, sea ecológico o convencional, tienen la obligación de proteger a los consumidores de todo tipo de riesgos ligados al proceso de producción, comercialización y consumo, así como optimizar dicha normativa con el tiempo con el objetivo de reducir tales peligros.

Por todos los argumentos expuestos anteriormente, surge a principios del año 2000 una iniciativa bajo el nombre de 'One Health', un enfoque colaborativo y coordinado entre distintas disciplinas con el objetivo esencial de escudar la salud de humanos, animales y ecosistemas, tres áreas estrechamente relacionadas. En el contexto europeo, este proyecto se desarrolla para enfrentar desafíos específicos relacionados con el control de enfermedades transmisibles y sus brotes, la promoción de prácticas sostenibles y la prevención de la resistencia a los antimicrobianos. Centrándose en esta última, 'One Health' reconoce la emergencia de microorganismos resistentes a antibióticos como un problema complejo y multifactorial que afecta por igual a los tres motivos que abarca y propone varias estrategias para prevenir el crecimiento de esta cuestión, desde la promoción del uso adecuado y responsable de antimicrobianos en todos los ámbitos, la vigilancia y el seguimiento hasta la investigación y desarrollo de fármacos. Esta iniciativa cuenta con la colaboración de organismos internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) o la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Comisión Europea, 2018; EFSA y ECDC, 2023).

Por otro lado encontramos los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), unas metas diseñadas para ser alcanzadas en 2030, establecidas por las Naciones Unidas (UN) con el objetivo de abordar y colaborar ante los desafíos sociales, económicos y ambientales más apremiantes a nivel mundial. De los 17 objetivos que componen esta iniciativa, el presente proyecto abarca cuatro de ellos principalmente, pues comprenden la seguridad alimentaria, salud y bienestar humano, producción y consumo responsable y la protección de ecosistemas terrestres.

- *Objetivo 2: Hambre cero.* Es posible una mejora de las prácticas agrícolas y garantizar la producción de alimentos nutritivos y seguros al reconocer y comprender la prevalencia y los procesos de resistencia a los antimicrobianos en las plantas, así como la provisión de todo tipo de alimentos mediante la estabilización del mercado y las cadenas de

- suministro internacionales. Con este objetivo en mente, se podría favorecer a pequeños agricultores y aumentar la correcta nutrición para los más pobres
- *Objetivo 3: Salud y Bienestar.* La resistencia a los antimicrobianos presenta un riesgo para la salud pública que, mediante una correcta investigación la tasa de mortalidad debido a enfermedades no transmisibles puede disminuir notablemente, con la ayuda además de una correcta prevención y un tratamiento adecuado.
 - *Objetivo 12: Producción y consumo responsables.* Mediante la implementación de prácticas agrícolas más responsables con el medio ambiente y sostenibles se respeta más la fertilidad natural del suelo y se disminuye su degradación, se reduce el uso innecesario de antimicrobianos (una de las principales causas de la emergencia de sus resistencias) y productos químicos plaguicidas, de forma que sería posible la producción de alimentos más seguros para el humano y el ecosistema.
 - *Objetivo 15: Vida de ecosistemas terrestres.* Como en el anterior, se promueven prácticas correctas y respetuosas con el objetivo de minimizar el impacto negativo en los ecosistemas y mantener la salud de los suelos y la biodiversidad, a la que los microorganismos resistentes y los productos que los combaten afectan enormemente.

1.2 ANTIBIÓTICOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Los antibióticos son tipos de fármacos que se emplean en el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano. Su mecanismo de acción generalizado es detener la propagación de contagios al prevenir el desarrollo y la reproducción de las bacterias o directamente provocando la muerte de las mismas. Con el objetivo de evitar la reproducción de los microorganismos o daño al huésped, los antimicrobianos se dirigen a elementos o funcionalidades particulares dentro de las células bacterianas, lo cual altera su funcionamiento rutinario (Walsh, 2003).

Tanto el descubrimiento como el desarrollo de los antibióticos han revolucionado la medicina moderna, proporcionando tratamientos efectivos ante la amenaza que suponen las infecciones bacterianas. Este período de innovación empezó en los años 20 del s.XX, cuando Alexander Fleming, el pionero en este campo, descubrió accidentalmente la conocida penicilina (Aminov, 2010). Tras este descubrimiento, un gran número de miembros de la comunidad científica se centraron en aislar y caracterizar este tipo de sustancias, y así fue como empezó la conocida como Edad de Oro de los antibióticos (1940-1960). A lo largo de estos años se obtuvieron fármacos como la estreptomina, cloranfenicol, o tetraciclina, que supusieron una ampliación importante del arsenal de fármacos ante las infecciones bacterianas de la época (Hutchings, 2019).

Pasada esta época, tras el excesivo uso que se les dio a estos fármacos, empezaron a ser descubiertas especies bacterianas que eran tolerantes a estas sustancias. La capacidad de cualquier agente terapéutico para usarse con éxito puede verse comprometida por la posibilidad de que se desarrolle tolerancia o resistencia al compuesto desde el momento de su primer uso. Pese a que en otros ámbitos específicos se ha llegado a soluciones relativamente rápido, en el caso de los antimicrobianos no ha sido así (Davies, 2010). La complejidad e incertidumbre que envuelve a todo el proceso de adquisición de resistencia dificulta conseguir soluciones efectivas que supongan prevención y/o control al desarrollo de esta misma resistencia.

Desde hace más de 15 años hasta la actualidad, un gran número de estudios advierte que pronto regresaremos a una situación similar a la época pre-antibiótica (Alanis, 2005; Boyanova, 2023; Tang, 2023), pues se han sacado a la luz datos preocupantes como todas las resistencias emergentes, nuevos mecanismos de acción de las mismas o el elevado número de genes de resistencia que han sido identificados, rondando los 20000 hace más de 10 años (Liu, 2009).

Ante la situación actual, numerosos estados miembros de la Unión Europea tienen tasas de resistencia de al menos el 25% entre los microorganismos que causan enfermedades graves en las personas. Dado que los antibióticos siguen siendo la principal línea de defensa en la lucha contra las enfermedades infecciosas, este marco teórico es grave. Su expansión es motivo de especial preocupación, además del desarrollo de nuevas bacterias resistentes a los antibióticos (ARB).

1.2.1. Clasificación de antibióticos según el mecanismo de acción

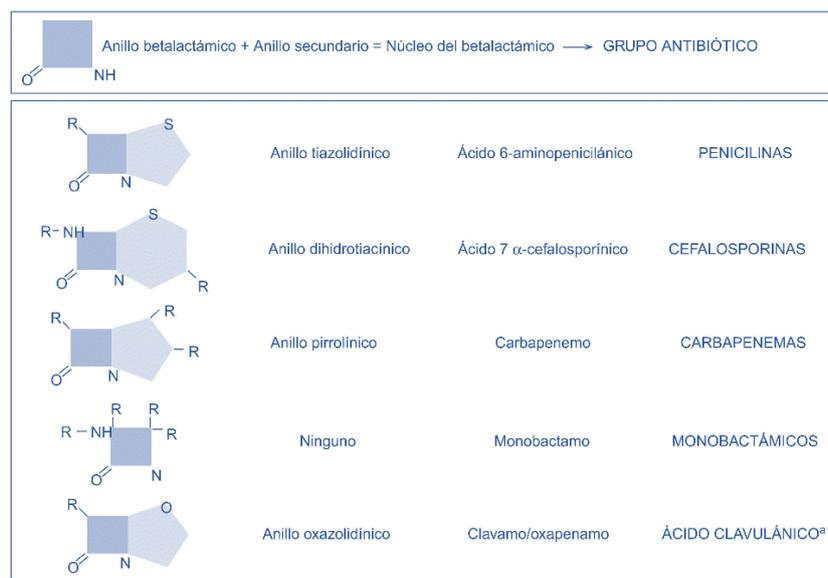
Los antibióticos se pueden clasificar atendiendo a varios criterios, pero suelen organizarse según el mecanismo de acción de los mismos y la función bacteriana intrínseca a la que afectan. Las tres categorías son descritas acorde a la publicación de *Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: Guide for Clinicians* (Kapoor et al., 2017).

Antibióticos dirigidos a la pared celular

La pared celular que rodea a las bacterias se compone de peptidoglicanos, es decir, polímeros de azúcares de largo tamaño; consta de un esqueleto de glicano de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, junto con cadenas peptídicas entrecruzadas que contienen aminoácidos, de tipo D y L (Heinz y Kandler, 1972) entre los que se encuentra la D-alanil-alanina intercalada con residuos de glicina siempre que estén PBPs (penicillin binding proteins) presentes, que fortalece altamente la pared celular. La mayoría de antibióticos que tienen como objetivo esta estructura se dedican a inhibir su síntesis.

Antibióticos betalactámicos

Los antibióticos clasificados como betalactámicos son aquellos que actúan sobre los PBPs presentes en la pared celular para inhibir la síntesis de la misma provocando la lisis mediante la disrupción de los peptidoglicanos. No obstante, se dividen en varios grupos dentro de este, diferenciándose según el punto de unión del anillo β -lactámico (Figura 1).



^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Figura 1. Tipos de beta-lactámicos Beta-lactam antibiotics. (Suarez y Gudiol, 2009)

Penicilinas. Este grupo deriva del producto procedente del hongo *Penicillium* y son sensibles al ácido clavulánico. El intermediario antigénico de este tipo de antibióticos es el ácido peniciloil, formado a partir del anillo betalactámico. Dentro de este grupo encontramos varios subtipos divididos según sus características y espectros de actividad que presentan; estos incluyen la **Penicilina G** (Benzilpenicilina) cuya actividad se centra principalmente en las bacterias Gram positivas dado que por la membrana externa se dificulta la penetración de este antibiótico; de manera similar existe la **Penicilina V** (Fenoximetilpenicilina); **Penicilinas resistentes a penicilinas** (antiestafilocócicas), modificadas químicamente para resistir este tipo de enzimas, se incluyen meticilina, oxacilina, entre otros; **Aminopenicilinas** (ampicilina, amoxicilina y derivados), destaca su amplio espectro de acción, centrándose en las bacterias de tipo Gram negativo, pero son sensibles a enzimas beta-lactamasas y finalmente **Penicilinas de amplio espectro** (antipseudomonales), son efectivas frente a una gran variedad de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y asimismo se pueden combinar con inhibidores de betalactamasas para incrementar la efectividad (MacDougall, 2017; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2016).

Cefalosporinas. Las cefalosporinas tienen su origen derivado del producto del hongo filamentoso *Cephalosporium acermonium*, cuando se aisló en 1940 por primera vez en Italia. Este grupo de antibióticos se clasifican en generaciones dependiendo del espectro de actividad y sus propiedades farmacocinéticas. A medida que se avanza en las generaciones, estos antibióticos tienden a tener un espectro de actividad más amplio, así como una mayor resistencia a enzimas lactamasas, como la β -estafilocócica o las de origen Gram negativo. No obstante esta resistencia se empieza a observar notablemente solo a partir de la cuarta generación. La primera generación, conocidas como fenilglicinas e incluyen cefadroxilo y cefradina, centra la actividad en cocos Gram positivos en contraste con las cefalosporinas de segunda generación, activas contra la mayoría de especies Bacteroides y en general bacilos Gram negativos; estas aumentan su actividad especialmente en *Haemophilus influenzae*, *B-fragilis* y *Neisseria spp.* Por otro lado tenemos las cefalosporinas de tercera generación (3G) que en general resultan tener mayor eficacia tanto contra bacilos Gram negativos como frente a los cocos Gram positivos que las generaciones anteriores, así como contra las productoras de beta-lactamasas. Son muy activas contra las bacterias Gram negativas exceptuando *Enterobacter* y *Citrobacter*. En este grupo se incluyen la ceftazidima y cefotaxima. Seguidamente tenemos las cefalosporinas de cuarta generación, con un espectro más amplio que ninguna de las generaciones anteriores y una mayor estabilidad contra alguno de los grupos comentados anteriormente. Por último, aún en desarrollo y objetivo de investigación, se encuentra la quinta generación, diferenciada de las anteriores por la acción efectiva contra *S.aureus*, resistente a meticilina, ausente en las otras generaciones de cefalosporinas (Moellering et al., 2012; Rivas y Ribas, 2002).

Carbapenémicos. Otra clase de antibióticos beta-lactámicos son los carbapenemes, donde se incluyen el imipenem, meropenem, doripenem, entre otros. Se trata de antibióticos de amplio espectro en general. La lisis provocada por este tipo de antimicrobianos es más rápida debida a la eficaz penetración de la membrana y estable unión a PBPs. Sin embargo, altos niveles de resistencias a estos antibióticos han sido detectadas por la presencia de carbapenemasas, presentes en un amplio rango de bacterias incluyendo el género *Pseudomonas* y la familia Enterobacteriaceae (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2016).

Monobactámicos. Este grupo de beta-lactámicos es de un espectro mucho más estrecho, lo cual se interpreta como un arma de doble filo, mientras que por un lado interviene solamente en los grupos de bacterias aeróbicas y Gram negativas, por otro no afectarán a la microbiota natural del organismo cuando se empleen; es por ello que su uso no es muy extenso. Uno de los antibióticos que pertenece a este subgrupo es el aztreonam (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2016).

Glicopéptidos

Este grupo se une a la fracción peptídica que presenta D-alanil D-alanina, que es la precursora de la subunidad de peptidoglicano. Estéricamente, la gran molécula de la vancomicina impide la unión de dicha fracción con el PBP y con ello la síntesis de la pared celular (Džidić, 2008).

Antibióticos inhibidores de la replicación de DNA: Quinolonas

Las quinolonas, también conocidas como fluoroquinolonas (FQs) inhiben la replicación del DNA bacteriano mediante la incapacitación de la enzima DNA girasa, responsable de unir los fragmentos y eliminar los superenrollamientos positivos que se dan en la molécula de DNA en el proceso de replicación, introduciendo negativos. Las funciones anteriores se realizan por las dos subunidades de la enzima, A y B respectivamente. Las FQ se unen con gran afinidad a la subunidad A impidiendo el corte y posterior unión de los fragmentos de ácido nucleico a lo largo de este proceso (Higgins, Fluit y Schmitz, 2003).

Antibióticos inhibidores de la biosíntesis de proteínas

A través de la transcripción y posterior traducción el DNA se traduce a aminoácidos a través de la acción de los ribosomas, orgánulo que cataliza este último paso de traducción. Este grupo de antibióticos se clasifica según afecta a una de las subunidades que compone el ribosoma bacteriano.

Inhibidores de la subunidad 30S. Por un lado están los aminoglicósidos (AGs) provocan poros en la superficie celular permitiendo la entrada del antimicrobiano en su interior. Estos suelen actuar junto a los inhibidores de la formación de la pared bacteriana. Por otro, tenemos las tetraciclinas, que a pesar de que el sitio de unión es el mismo que los AGs, el gen 16S ribosomal, su acción consiste en impedir la entrada del tRNA en el ribosoma.

Inhibidores de la subunidad 50S. Aunque tengan el mismo sitio de unión en la subunidad, el rRNA 23S, podemos dividir los compuestos de este apartado en tres tipos distintos, cloranfenicol, macrólidos y oxazolidinonas.

Antibióticos inhibidores del metabolismo de ácido fólico: sulfonamidas y trimetoprima

Estos compuestos actúan en distintos pasos a lo largo de la ruta biosintética del ácido fólico, lo que dificulta la aparición de resistencias a estos, dado sus dispares mecanismos de acción.

1.3 RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

Una de las amenazas que más concierne a toda la comunidad tanto agrícola como científica en general es el riesgo microbiológico, más concretamente la presencia de microorganismos bacterianos que presenten mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Michael, C., et. al, 2014). Posteriormente a la generalización de su uso en varios ámbitos, la búsqueda e investigación para encontrar nuevos fármacos antibióticos está en decadencia debido a varios factores como la aparición de otras medicaciones más específicas, intereses económicos y políticos, pero principalmente la corta vida útil actual de los mismos dada la aparición de las resistencias (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Esta crisis global sigue aumentando su incidencia día a día, pues los organismos resistentes a antimicrobianos (AMR) provocan enfermedades infecciosas que de momento carecen de cura. Esta recesión se debe principalmente a tres factores: (1) los fenotipos de tipo AMR son cada vez más frecuentes entre los microorganismos generales debido a una respuesta evolutiva al uso generalizado de los antibióticos, (2) la elevada población mundial y las extensas interconexiones permiten que los patógenos se muevan con facilidad de un sitio a otro lo que les proporciona acceso a toda la humanidad (Lipsitch y Samore, 2002) y finalmente (3) el uso extenso y por lo regular innecesario de los antibióticos supone una presión evolutiva muy elevada que desencadena la respuesta exacerbada en las especies microbianas (Sykes, 2010).

La resistencia antibiótica puede clasificarse de dos formas distintas diferenciándose en el origen de las mismas, si es adquirida o por el contrario, intrínseca. La resistencia intrínseca radica en características ya presentes en la bacteria, inherentes en su estructura o funcionalidad, por ejemplo, la ausencia de la diana de acción del antibiótico, impermeabilidad de las membranas, entre otros. Por el contrario, la resistencia adquirida se halla en cambios genómicos de gran variedad, desde mutaciones puntuales o DNA exógeno que confiere algún tipo de característica que aporte esta resistencia (Baran, Kwiatkowska y Potocki, 2023).

1.3.1. Mecanismos de resistencia

Permeabilidad de la membrana. La función de la membrana plasmática (MP) es esencialmente ejercer como una separación entre el espacio extracelular y el citoplasma mediante la bicapa lipídica que la compone, cuyas características de fluidez y flexibilidad están directamente ligadas con la permeabilidad de la misma. (Vance y Vance, 2002). La membrana plasmática de las bacterias ayuda a ralentizar la entrada de pequeños compuestos, no obstante no asegura la obstrucción total y por ello no puede actuar en solitario como mecanismo de resistencia a medicamentos, es por ello que algunos microorganismos han desarrollado factores adyuvantes: enzimas como la β -lactamasa o el flujo activo de *P. aeruginosa*, que pueden presentar fuertes efectos sinérgicos en los niveles de resistencia (Hancock y Brinkman, 2002).

Bombas de flujo. Estas estructuras han sido documentadas en bacterias tanto de tipo Gram positivas como Gram negativas, productoras y no productoras de antibiótico, y pueden presentar distintos niveles de especificidad, desde una sola molécula a un abanico mucho más amplio de sustancias. En esencia, su función es la expulsión de sustancias tóxicas, bien para las mismas células en forma de defensa interna o externa, expulsando antimicrobianos propios (Piddlock, 2006). La resistencia a antibióticos como la tetraciclina o cloranfenicol por parte de la *P. aeruginosa* fue inicialmente atribuida a la permeabilidad de la MP, pero posteriormente se descubrió que la base eran estas estructuras de flujo activo (Cox y Wright, 2013; Li et al., 1994).

Modificación del sitio de acción del antibiótico. Dentro de este mecanismo de resistencia encontramos una mezcla heterogénea de modos de acción. En el caso de las bacterias resistentes a antibióticos del tipo beta-lactámico, la resistencia está basada en una modificación de las estructuras naturales de PBPs. Los genes de la familia 'mec', destacando mecA y mecC, aportan resistencia a casi todos los betalactámicos exceptuando la cefarolina y ceftobripol; por otro lado, mecB aporta resistencia a *S. aureus* y *S. pneumoniae* mediante su presencia en un plásmido (Hawkey, 1998). La resistencia a glicopéptidos se da por la síntesis de precursores de peptidoglicanos alterados mediante operones tipo Van presentes en el genoma bacteriano (Ge

et al., 1999), VanA y VanB en trasposones, transferibles entre distintas especies mediante plásmidos o fracciones cromosómicas (Ahmed y Baptiste, 2018).

Inactivación enzimática. Este proceso puede ser ejecutado por tres metodologías distintas, siendo estas hidrólisis, transferencia de grupos o procesos de reducción-oxidación.

En el caso de las resistencias al grupo de beta-lactámicos se basa en la hidrólisis mediada por enzimas codificadas en genes cromosómicos o plasmídicos en zonas como integrones o transposones. Estos genes pueden expresarse constitutivamente o bien de forma inducida, más de 2000 genes distintos han sido identificados y son conocidos con el nombre “bla”. (Drawz y Bonomo, 2010). Las beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL/BLEE) cuyas funciones son hidrolizar y generar las resistencias a cefalosporinas y otros grupos de antibióticos, se han vuelto más comunes y su incidencia ha aumentado durante los últimos años. Este tipo de enzimas tienen dos tipos de clasificaciones: la clasificación molecular de Ambler, que las secciona en cuatro grupos dependiendo de la homología de la proteína siendo estos grupos A, B, C y D; paralelamente, la clasificación Bush-Jacoby-Medeiros se basa en las características funcionales de las enzimas, como el perfil de sustrato e inhibidor (Shaikh, 2015). La gran mayoría de estas BLEE han derivado a partir de TEM-1 y SHV-1. CTX-M, una nueva familia de BLEE mediada por plásmidos y responsable de la hidrolización de la cefotaxima ha emergido recientemente y está desbancando a las enzimas TEM y SHV como tipo prevalente de BLEE (Bradford, 2001; Falagas y Karageorgopoulos, 2009). Finalmente, también cabe destacar las OXA BLEE, que presentan una gran variedad de dianas, desde oxacilina, carbapenemes, penicilinas incluso algunas cefalosporinas (Sawa, Kooguchi, y Moriyama, 2020). Afortunadamente la investigación está llevando al desarrollo de inhibidores de beta-lactamasas, como el relabactam (Heo, 2021).

La resistencia a aminoglicósidos reside en la actividad de transferencia de grupos fosfato (APH), nucleótidos (ANT) o grupos acetilo (AAC), cuyos genes se localizan en plásmidos, integrones, transposones o casetes, lo que contribuye a la expansión entre las poblaciones bacterianas (Jaimee y Halami, 2016).

Por último, la resistencia originada por reacciones redox se centra en las tetraciclinas (Markley y Wencewicz, 2018).

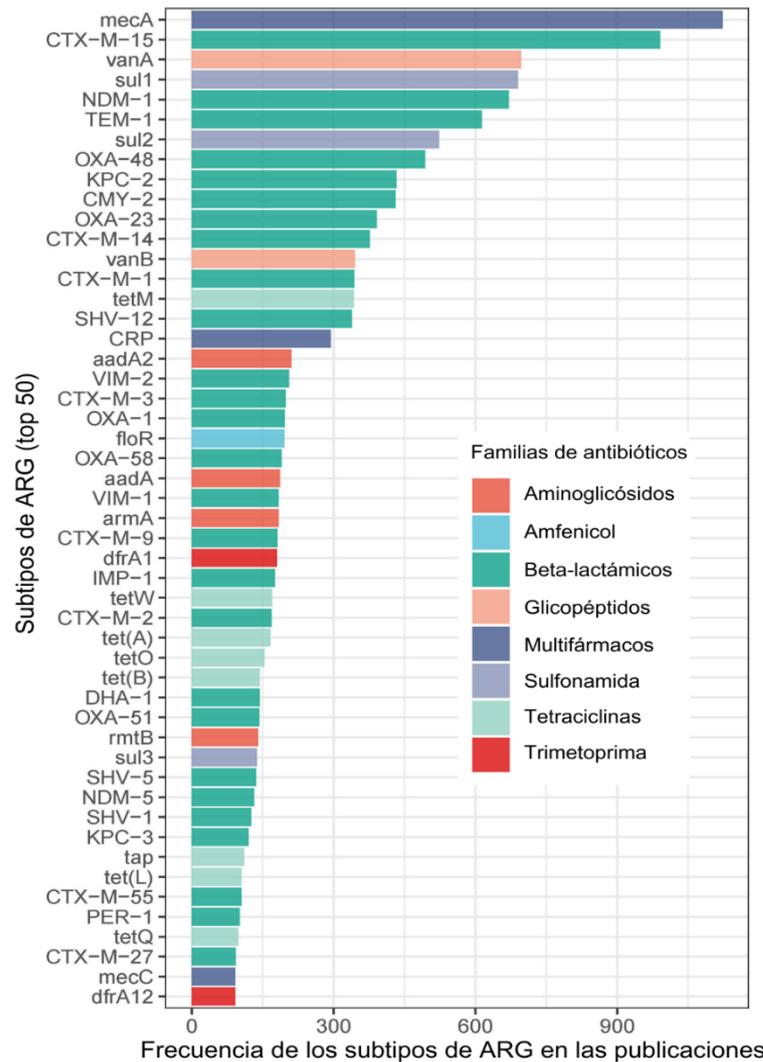


Figura 2. Frecuencia de los principales 50 subtipos de genes de resistencia a antibióticos, y sus respectivas familias antibióticas de las publicaciones en PubMed de los últimos 30 años (Zhuang et al., 2021).

1.3.2. Mecanismos de propagación de resistencias.

La transmisión de la capacidad de resistencia bacteriana a antibióticos puede darse intrínsecamente entre organismos microbiológicos o a factores externos que tienen raíz antropológica, es decir, a través de distintos ámbitos en donde la actividad humana está implicada.

Transferencia horizontal.

La resistencia antibiótica puede estar codificada por elementos genéticos que pueden encontrarse en el cromosoma de las bacterias o en elementos genéticos móviles que facilitan la transferencia de estos genes de manera intra o interespecífica, transmisión vertical u horizontal respectivamente. Esta última es la ruta principal de transmisión de genes de resistencia, incluyendo mecanismos como la conjugación, transformación, transducción y vesiducción (Yuan et al., 2023).

El proceso celular de conjugación consiste en la transferencia de genes mediante el contacto directo con elementos genéticos móviles entre donante y beneficiario, que pueden contener más de un gen de resistencia (McInnes et al., 2020). Por otro lado, la traducción se trata de la

integración estable de DNA desnudo del medio extracelular proveniente de células competentes, desde un plásmido a un fragmento aislado de DNA genómico (Johnston et al., 2014). Mediante la infección de la célula competente que actúa como donante por parte de fagos tiene lugar la transducción, en la que los genes de resistencia se encapsulan en el virus y son liberados tras la posterior infección de la célula recipiente. Por último, la vesiducción es un proceso descubierto recientemente, el cual incluye todos los procesos de transferencia horizontal que tienen lugar mediante vesículas extracelulares, cuya función en este caso será proteger el DNA del donante de la degradación que sufre en el medio extracelular (Soler y Forterre, 2020).

Origen antropogénico.

Muchas de las especies bacterianas han evolucionado para llegar a tolerar los compuestos antibióticos antes de que los humanos los produjésemos en masa. Aún así, este hecho ha provocado una presión evolutiva mayor que ha resultado en el desarrollo de nuevas rutas para la expansión bacteriana y consecuente adaptación y adquisición de resistencias evitando las barreras que aparentemente restringen el flujo de patógenos y sus genes (D'Costa, 2011). Actualmente esto les resulta más fácil dada la estructura altamente globalizada que presenta la comunidad que aumenta la dificultad para prevenir y tratar estas infecciones, y asimismo el uso de antibióticos está mucho más extendido en una gran variedad de ámbitos.

El consumo inadecuado de los antibióticos, que se observa continuamente en el ámbito sanitario, es una de las principales causas de emergencia de resistencias dado el aumento de presión de selección que esto supone, provocando mutaciones puntuales espontáneas. En el sector primario encontramos un problema similar, sobretudo en ganadería, donde este tipo de fármacos se usa para el tratamiento de infecciones, la prevención de las mismas (profilaxis) o incluso para modificar el desarrollo natural del ganado (Parlamento Europeo, 2019; Martin et al., 2015). Es por ello que se han establecido políticas de regulación que han resultado en una mejora importante del sector sin perjuicios en los productos.

La presencia de microorganismos resistentes a antibióticos en medios acuáticos se debe a un conjunto de fuentes, desde las granjas de acuicultura, aguas residuales hasta pozos y aguas subterráneas (Baquero, Martínez and Cantón, 2008); donde tiene lugar un intercambio genético entre las bacterias de orígenes varios, como la microbiota animal y humana con bacterias ambientales. La contaminación en los sistemas acuáticos se debe principalmente a las depuradoras de aguas residuales que se encargan del tratamiento de las aguas fecales. Las bacterias con genes de resistencia antibiótica presentes en estas aguas no son eliminadas en su totalidad permaneciendo en un ámbito de presión selectiva que contribuye a la propagación de las mismas. Asimismo, las aguas que no están en corriente continua y generan cierto sedimento son propensas localizaciones para el desarrollo de cepas resistentes (Gao et al., 2022).

En cuanto a la actividad agrícola, el uso de antimicrobianos se centra en la eliminación de bacterias que surgen por contaminaciones en los productos de cultivo, como son las aguas de riego o el abono, alterando la microbiota del suelo que provoca numerosas alteraciones en las plantaciones y en el metabolismo de las plantas (Cycoń et al., 2019). Los cultivos ecológicos tienen como objetivo la promoción de una dieta abundante en vegetales frescos y orgánicos; no obstante estos vegetales son cada vez más ampliamente reconocidas como posibles portadoras de bacterias que propagan enfermedades transmitidas por los alimentos. Además, las verduras que se producen cerca del suelo se consumen con frecuencia crudas, lo que aumenta el riesgo de infección para los consumidores (Ruiz-Roldán et al., 2021). Para evitar una mayor exposición del estómago del consumidor a los ARB recién formados, es mejor evitar comer vegetales crudos y sin tratar (Li, 2023).

2. OBJETIVOS

El objetivo que se plantea para este proyecto es establecer la calidad microbiológica de los vegetales de etiqueta ecológica frente a los convencionales de la zona de Valencia y alrededores. Mediante el uso de técnicas genético moleculares, también se espera evaluar su función como portador de bacterias que tienen la capacidad de transmitir genes de resistencia a antibióticos entre especies. Con esto en mente se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar de modo dirigido bacterias del tipo Gram negativas sospechosas de ser resistentes a cefalosporinas y carbapenemes de tercera generación.
2. Estudiar la sensibilidad de las cepas aisladas a antimicrobianos (cefotaxima (cefalosporina 3G), ceftazidima (cefalosporina 3G), imipenem (carbapenem), meropenem (carbapenem)).
3. Identificar los microorganismos que presentan resistencias mediante métodos genéticos y moleculares, a través de secuenciación Sanger del gen 16S rDNA.
4. Analizar las disparidades entre los cultivos ecológicos y convencionales en cuanto a los patrones de resistencias en los aislados presentes en sendos vegetales

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS

El material vegetal se ha recolectado semanalmente de distintas fuentes desde febrero a junio. Las muestras consisten en varios tipos de lechuga (*Lactuca sativa*) (romana, maravilla, roure verde y roure roja, endivia y escarola), kale (*Brassica aleracea var, sabellica L*), espinacas (*Spinacia aleracea*) y finalmente col (*Brassica aleracea var, Capitata*). Estos productos provienen de orígenes tanto orgánicos (60%) como convencionales (30%) obteniendo un total de 40 muestras (Tabla 1).

Tabla 1. Recopilación de muestras analizadas. Tipo de vegetal, abreviatura, nº de muestra y fecha de toma de muestra y análisis.

Vegetal	Abreviatura	Nº de muestra	Fecha de extracción (2023)
Kale	K	P1	Marzo
		P4	Marzo
		P12	Marzo
		P19	Abril
		P24	Mayo
		P34*	Junio
Lechuga Romana	LRM	P2	Marzo
		P6	Marzo
		P13*	Abril
		P28*	Junio
		P39*	Junio
Lechuga Maravilla	LM	P3	Marzo
		P9	Marzo
		P23*	Abril
Lechuga Roure Roja	LRR	P16	Abril
		P20	Abril
		P31	Junio
		P38*	Junio
Lechuga Roure Verde	LRV	P7	Marzo
		P17	Abril
		P21	Abril
		P30*	Junio
Lechuga Escarola	LEC	P22*	Abril
		P25	Mayo
Lechuga Endivia	LE	P14*	Abril
Espinacas	ES	P5	Marzo
		P10	Marzo
		P15*	Abril
		P18	Abril
		P26	Mayo
		P32	Junio
		P33*	Junio
		P36	Junio

		P40*	Junio
Col	CL	P11	Marzo
		P27	Mayo
		P29*	Junio
		P35	Junio
		P37*	Junio

*Cultivo convencional

Las muestras fueron obtenidas de 13 comercios distintos repartidos por toda la provincia de Valencia, cinco de los cuales eran comercios convencionales y el resto de venta de producto de origen ecológico.

3.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE COLONIAS

Una vez se trasladaron las muestras al laboratorio, se extrajeron las hojas externas que posteriormente se cortaron y homogeneizaron en condiciones de asepsia. Se tomaron 10 gramos de cada ejemplar y se introdujeron en bolsas estériles de 400 mL para stomacher de BagPage® (Interscience BagSystem, Saint Nom la Bretèche, Francia), donde se incubaron durante 24 horas junto con 90 mL de Agua de Peptona Tamponada (APT) (Scharlau, Barcelona, España) a la que se le añadió como suplemento dos antibióticos (vancomicina (glicopéptido) 8mg/L y meropenem 1mg/L) y así restringir el crecimiento de todas las bacterias Gram positivas. Las muestras se homogeneizaron manualmente mediante un masajeo ligero.

3.2.1 Cultivo de colonias en Super Carba (SC)

Para el aislamiento de las colonias de los distintos microorganismos presentes, tras las 24 horas de incubación a 37°C y en aerobiosis de la muestra con APT en la bolsa, se tomaron 100 µL del homogeneizado y se sembró en superficie con ayuda de un asa de Digralski en placas de medio de cultivo Cromogéno SuperCarba (SC, CHROMagar mSuperCarba base, Paris, Francia). Este medio está destinado a la detección y aislamiento de Enterobacterias resistentes a Carbapenemasas. Una vez sembradas las placas, se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 24h.

Adicionalmente, se tomaron 20-30 mL del caldo de APT incubado en un tubo tipo Falcon estéril para su almacenamiento a -20°C para preservar los microorganismos presentes en el vegetal en caso de que sea necesario de nuevo o para la posterior extracción de DNA y la identificación de los genes de resistencia a antibióticos (cefalosporinas y carbapenem) en futuros trabajos.

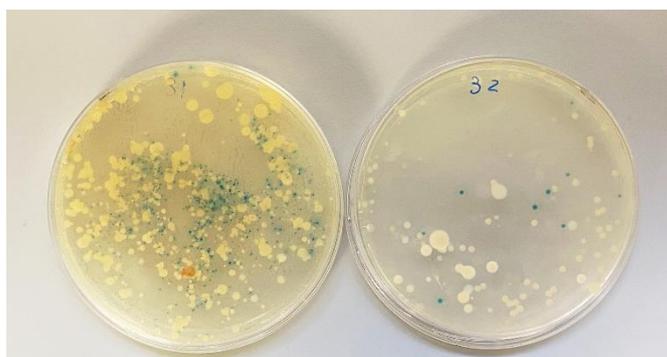


Figura 3. Crecimiento de colonias de las muestras P31 y P32 en SC.

3.2.1.1 Lectura de cultivos en SC

Dado que el medio SC es cromógeno permite una fácil diferenciación de microorganismos mediante la tinción de las bacterias presentes en el cultivo basada en la actividad enzimática específica de cada especie, presentando colores rosados (*E.coli*), azul-verdoso (enterobacterias como *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*) o claro y opaco (*Acinetobacter spp.*)

3.2.2 Cultivo de colonias en Plate Count (PCA)

Para la obtención de un cultivo axénico se sembró cada una de las colonias obtenidas en el primer cultivo anterior de SC en otra placa de PCA (Scharlau, Barcelona, España) mediante la metodología de triple estría con un asa de siembra bacteriológica. Tras su incubación a 37°C durante 24 horas crecieron colonias a partir de las cuales se obtuvieron los cultivos puros.

3.3 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

La finalidad de este paso es la selección específica de microorganismos resistentes a cefalosporinas y carbapenemes 3G a partir de los cultivos puros obtenidos mediante los pases de cultivos anteriores, dónde a través de todas las barreras antimicrobianas (VAN y MEM en APT) se habrán obtenido principalmente enterobacterias. Este estudio se realizará mediante el método de antibiograma disco-placa (SEIMC, 2000).

Los antibióticos seleccionados (Tabla 2) que se dispensaron en forma de discos, corresponden a dos familias de antimicrobianos distintas, por un lado cefalosporinas y por otro carbapenemes (Fisher scientific, Madrid, España). Asimismo, se dispensaron discos que incluyen ácido clavulánico (Liofilchem, TE, Italia), un conocido inhibidor de las beta-lactamasas presentes en muchas bacterias, de forma que se pudo estudiar la disparidad de sensibilidad con o sin la acción de estas enzimas. Estos discos fueron seleccionados en base al actual interés en el estudio de la presencia de enzimas beta-lactamasas y su papel en la resistencia bacteriana. El objetivo de aplicar discos que contienen ácido clavulánico es conocer si las bacterias resistentes a los mismos sin este compuesto lo son esencialmente por la presencia de enzimas beta-lactamasas (BLEE), cuya actividad quedará inhibida por esta sustancia y por lo tanto se observará un halo notablemente mayor, que se tendrá en cuenta siempre que sea 5 mm mayor que los de los antibióticos sin dicho ácido (Chaudhary y Aggarwal, 2004). Se dispensaron como discos de 6mm de diámetro (OXOID Antimicrobial Susceptibility test disc).

Tabla 2. Antibióticos β -lactámicos seleccionados para el estudio de sensibilidad

Grupo	Antibiótico	Abreviatura	Carga del disco (μ g)	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
				R	I	S
Cefalosporinas	Cefotaxima	CTX	30	≤ 14	15-22	≥ 23
	Ceftazidima	CAZ	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Carbapenemes	Imipenem	IPM	10	≤ 13	14-15	≥ 16
	Meropenem	MEM	10	≤ 13	14-15	≥ 16
	Cefotaxima + clavulánico	CTL	30 + 10			

Cefalosporinas con clavulánico	Ceftazidima + clavulánico	CAL	30 + 10	Un halo de $\geq 5\text{mm}$ de diámetro más ancho en los discos con clavulanato es indicio de BLEE. (CTX-CTL; CAZ-CAL)
--------------------------------	---------------------------	-----	---------	---

Para la realización de este procedimiento creció cada uno de los cultivos puros procedentes de las colonias durante 24 horas. Se inocularon en un tubo eppendorf de 1,5 mL con 1 mL de PBS 1x estéril hasta obtener una turbidez correspondiente a 0,5 en la escala de Mc Farland tras agitarlo en un vórtex durante 15 segundos.

Se embebió un hisopo estéril (Transystem 140C, Copan. CA, EEUU) en el Eppendorf con PBS y se inocularon dos placas de agar Mueller-Hinton (MH) (Scharlab, Barcelona, España) por cada una de las cepas. En estas placas el hisopo se pasó en todas direcciones con el objetivo de cubrir toda la superficie uniformemente. Tras dejar pasar un par de minutos se depositaron los discos de antibióticos con el dispensador (OXOID Antimicrobial Susceptibility Testing Disc Dispenser), siempre en condiciones de asepsia.

En este caso se colocaron 4 discos en una placa, correspondientes al grupo de los cefalosporinas, y en la otra placa dos, los carbapenemes, de forma que se intentó evitar el solapamiento entre los halos que se formen tras su incubación. Es conveniente limpiar con etanol o hipoclorito sódico la base del dispensador tras cada uso para evitar las contaminaciones entre cultivos.

Las placas inoculadas se incubaron 24 horas a 37°C y una vez transcurrido este tiempo se midió el halo de inhibición de cada antibiótico en la cepa determinando la longitud del diámetro del halo en milímetros. A partir de este valor se clasificaron las cepas según su sensibilidad en las tres categorías posibles: sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) (Tabla 3).

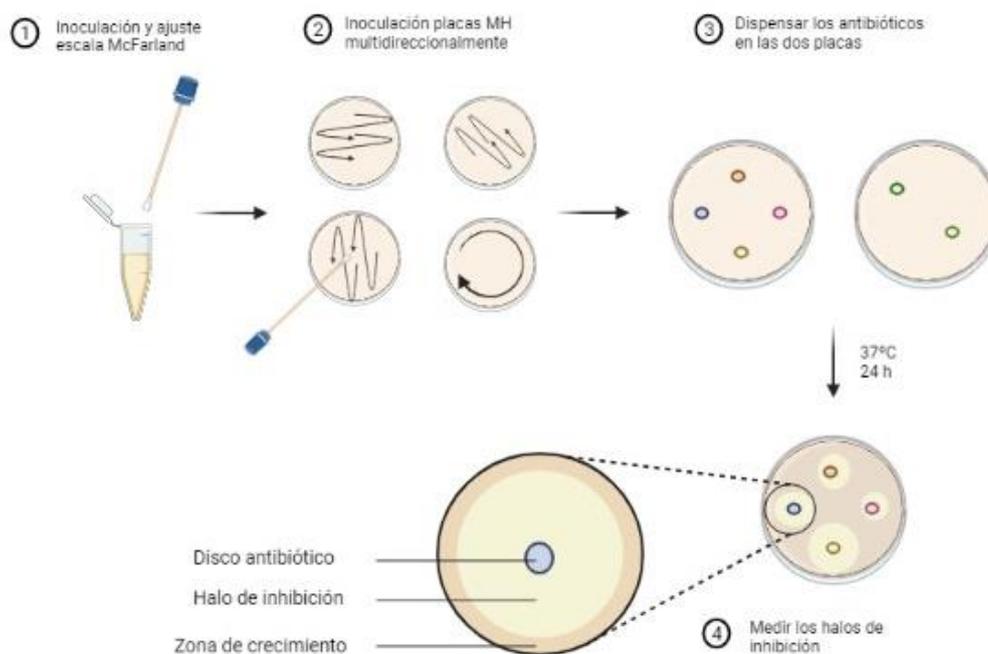


Figura 4. Esquema de procedimiento de realización y lectura de un antibiograma con el método disco-placa para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos. (Elaborado en Biorender.com)

Si en las placas se observan varios halos o colonias dentro de los mismos puede tratarse de contaminaciones, un cultivo de partida no puro, mutantes resistentes... por lo que si se da esta situación, es conveniente repetir el proceso separando ambas poblaciones bacterianas.

3.3.1. Conservación de las cepas

Tras el estudio de sensibilidad es crucial la conservación a largo plazo de las cepas resistentes en caso de que sean de interés para futuros proyectos o investigaciones con las mismas. Para ello se toma la muestra directamente de la placa de PCA donde se encuentra el cultivo axénico y con una asa bacteriológica se introduce y resuspende en un tubo de crioconservación con esferas de plástico y medio de glicerina (VWR Preservation System Cryoinstant, Barcelona, España) y posteriormente se conservan a -80°C indefinidamente.

3.4 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

La identificación de los microorganismos que presentan resistencias a antibióticos obtenidos en el paso anterior se identificaron mediante secuenciación sanger, concretamente con la secuenciación del gen 16S rDNA, a partir del DNA obtenido de las mismas.

El gen 16S rDNA es ampliamente usado para la caracterización de la filogenia y taxonomía bacteriana por varios motivos, se trata de un gen altamente conservado en el dominio bacteriano, tanto su presencia en el genoma como su funcionalidad y es lo suficientemente extenso (1500 pb) como para una correcta realización de estudios informáticos sobre el mismo. (Janda, 2007).

3.4.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de las cepas resistentes aisladas se partió de los cultivos puros que fueron resuspendidos en PBS 1x, posteriormente estas suspensiones se centrifugan a $5000 \times g$ durante 10 minutos, para obtener aproximadamente $1,5 \times 10^9$ células bacterianas por cada mililitro.

Seguidamente se realizó la extracción de DNA total mediante el kit de extracción comercial GeneJET Genomic DNA Purification kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU); específicamente el protocolo "E" que corresponde a las indicaciones del fabricante para las bacterias Gram negativas.

3.4.2 PCR estándar y electroforesis

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó mediante una PCR convencional, a partir de las extracciones de DNA que se han llevado a cabo anteriormente.

a. Primers

Para la detección y amplificación de este gen se utilizaron los primers universales 27F y 1492R (TIB Molbiol, Berlin, Alemania), cuyas secuencias y fracciones genómicas con las que alinean se presentan en la Figura 5.

	27F-primer		1492R-primer
	5' AGAGTTTGATC (C/A) TGGCTCAG-3'		3' -TTCAGCATTTGTTCCAT (C/T) GGCAT-5'
<i>B. subtilis</i> -16S rDNA	-AGCCTCTCAAAC TAG G ACCGAGTCCT-		-GGTGAAGTCGTAACAAGGTA G CCGTATC-
<i>V. anguillarum</i> -16S rDNA	-AACTTCTCAAAC TAG T ACCGAGTCAA-		-GGTGAAGTCGTAACAAGGTA A CCGTAGG-
<i>V. fischeri</i> -16S rDNA	-AACTTCTCAAAC TAG T ACCGAGTCAA-		-GGTGAAGTCGTAACAAGGTA A CCGTAGG-

Figura 5. Alineamiento de las secuencias de los primers de amplificación universal 27F y 1492R y sus regiones objetivo del gen 16S rRNA de *B. subtilis*, *V. fischeri*, y *V. anguillarum*. (Polz and Cavanaugh, 1998)

b. Amplificación

Para la correcta realización de la PCR convencional se emplearon 2 µL de ADN en 50 µL que se obtienen finalmente cuando se añaden los 48 µL de reactivos. Asimismo, se usaron tanto controles positivos a partir de extractos de *E. coli* de proyectos anteriores y agua MiliQ estéril como control negativo.

Las etapas de la PCR se correspondieron a un programa pre-configurado en el termociclador (Techne 3Prime, Reino Unido) específico para el gen 16S rRNA. Está programado para un total de 35 ciclos junto con una desnaturalización inicial y una extensión final adicionales (Tabla 3).

Tabla 3. Enumeración de ciclos para PCR estándar en el termociclador

Programa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación inicial	105	5 min	
Desnaturalización inicial	95	5 min	1x
Desnaturalización	95	60 seg	35 x
Annealing	53	45 seg	
Extensión	72	60 seg	
Extensión final	72	7 min	1x
Hold	4	∞	

c. Electroforesis en gel de agarosa

Con el objetivo de comprobar la correcta amplificación del gen se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa 1%, para el que se disuelven 0.75 g de agarosa en 70 mL de Tris Borato EDTA (TBE) 1x (Tris base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Tras la ebullición y atemperado se añadieron 3 µL de la tinción de ácido nucleico RedSafe (Nzytech Premium, Barcelona, España), ya que permite la observación de las bandas posteriormente. A partir de este paso se procedió en un ambiente lo menos luminoso posible para asegurar la funcionalidad del compuesto RedSafe. Seguidamente se vertió el polímero en el molde montado para la electroforesis y se solidificó en un soporte nivelado y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiró el molde y el gel se introduce en la cubilla de electroforesis y se sumerge en TAE 1x. Por último, en cada uno de los carriles donde se introdujeron muestra o control, se cargaron 15 µL del producto de PCR homogeneizados con 2

μ L de tampón de tinción de carga (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU). Finalmente, es necesario cargar un marcador de peso molecular, en este caso se ha empleado lambda DNA ladder (1500 pb) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Las condiciones del proceso fueron de 90V durante 75 minutos en parcial o total oscuridad. La visualización de bandas se llevó a cabo en un transiluminador con luz UV acoplado a un cómputo de captación de imágenes (Vilber, Marne-la-Vallée, Francia).



Figura 6. Aislado del gen 16S rRNA en electroforesis con gel de agarosa. (1. Marcador λ DNA, 2. Control positivo *E. coli*, 3. Control negativo agua MilliQ, 4. Muestra 1, 5. Muestra 2)

3.4.3 Secuenciación 16S rRNA

En el caso de que la PCR y la electroforesis hayan salido exitosas para una muestra, posteriormente se purificó el producto de PCR de dicha muestra, eliminando iniciadores y otros reactivos presentes, con la finalidad de secuenciar únicamente el producto de 1500pb.

A partir de los productos de PCR se obtuvieron 25 μ L de gen 16S rRNA purificado mediante el GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Illustra GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Se midió la concentración mediante el sistema NANODROP y se ajustó la concentración a la exigida por el sistema de la empresa de secuenciación (IBMCP), que la llevó a cabo mediante Sanger.

4. RESULTADOS

En este apartado se presentan e interpretan los resultados obtenidos en el análisis de las 40 muestras vegetales. Se expondrán las cepas aisladas y el perfil de sensibilidad antibiótica de las mismas. Finalmente se concretará, mediante PCR y secuenciación sanger, la especie de los microorganismos resistentes.

4.1 SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS

Se consiguieron obtener un total de 49 cultivos axénicos de los que, tras realizar el antibiograma, solamente 30 resultaron ser resistentes a alguno de los antibióticos con los que se testaron. Se encontraron nueve patrones de resistencia distintos que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Patrones de resistencia de los cultivos puros.

Patrones de resistencia	Nº de cepas	Nº de cepa
CTX	6	P26C1, P32C1, P33C1, P35C1, P36C1, P40C3
CAZ	4	P22C1, P36C3.1, P36C2, P38C1
CTX-CAZ	6	P10C1, P10C2, P13C1, P17C2, P34C1, P37C1
CTX-MEM	1	P25C1
CAZ-MEM	1	P12C2
IPM-MEM	2	P27C1, P30C1
CTX-IPM	1	P35C2
CTX-IPM-MEM	3	P4C1.2, P21C1.2, P23C1
CTX-CAZ-IPM-MEM	6	P4C1.1, P4C2, P4C3, P5C1, P5C2, P6C1

CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, IPM: imipenem, MEM: meropenem

Para las 30 cepas puras que presentan al menos un tipo de resistencia, se encontraron un total de 9 perfiles de resistencia distintos. Tres de estos perfiles se componen solamente por cefalosporinas de tercera generación (3G), cinco de los restantes consisten en la mezcla de las cefalosporinas con los carbapenemes en diferentes combinaciones, y finalmente solo hay uno que es exclusivamente resistencia a los carbapenemes estudiados. Los tres perfiles más comunes son la resistencia exclusiva a cefotaxima (3G), la resistencia a ambas cefalosporinas, cefotaxima y ceftazidima, y finalmente la resistencia a los cuatro antibióticos testados, todos de tipo β -lactámico, cefotaxima, ceftazidima, imipenem y meropenem. Estos tres perfiles corresponden a seis cepas cada uno, siendo igual de abundantes entre los nueve presentes. A estos le sigue la resistencia a ceftazidima, presente en cuatro cepas; a cefotaxima y carbapenemes en tres y a carbapenemes solamente en dos cepas. Por último, para la combinación de una cefalosporina con un carbapenémico, hay tres combinaciones, cada una con una cepa identificada (CTX-MEM; CAZ-MEM; CTX-IPM).

En la Figura 7 se refleja la susceptibilidad conjunta a los cuatro antibióticos que han sido ensayados en estas 30 cepas, los cuales pertenecen al grupo de los β -lactámicos (cefalosporinas y carbapenemes).

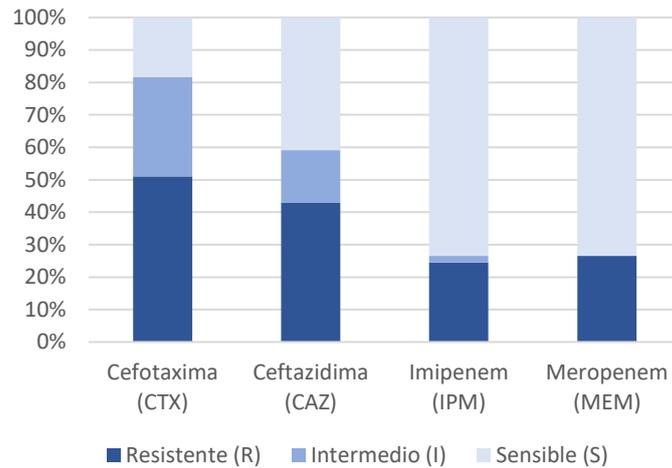


Figura 7. Sensibilidad individual a antimicrobianos de las cepas aisladas

Los resultados obtenidos son bastante variados, revelando sensibilidades muy distintas a los antibióticos. Se puede observar una tendencia al alza en la resistencia si nos centramos en las cefalosporinas, pues tienen el porcentaje más alto de cepas resistentes a ellas, por un lado, CTX con un 51% de resistentes, y por el otro CAZ, con poco menos de la mitad (42,9%). Por el contrario, los antibióticos del grupo de los carbapenemes, IPM (24,5%) y MEM (26,5%) son los que menor resistencia presentan; aun así, los niveles de susceptibilidad no son los suficientemente bajos como para considerarse especialmente eficientes.

A continuación, se muestran los resultados de los estudios de sensibilidad según el vegetal de partida (Figura 8, 9, 10 y 11). En el caso de las lechugas, se encontrarán agrupadas en un mismo gráfico para simplificar el análisis.

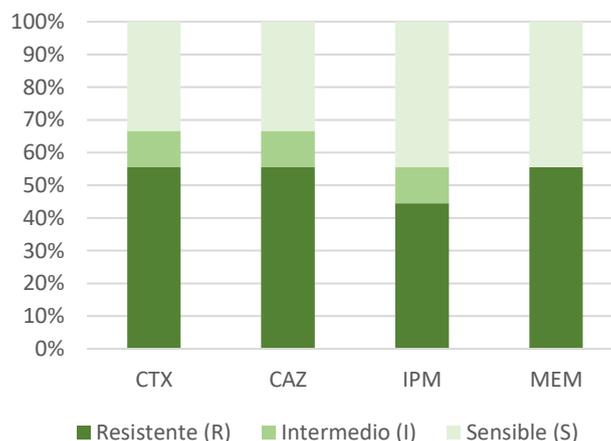


Figura 8. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de kale.

En el caso de las muestras obtenidas a partir de kale, de los nueve cultivos puros solamente 6 (66,7%) presentaron algún tipo de resistencia. Estas resistencias son de un nivel similar para todos los antibióticos testados, entre un 40 y un 60% de las colonias son resistentes para los mismos. El menor porcentaje de resistencia lo presenta el imipenem, al igual que en general de todas las muestras (Figura 7).

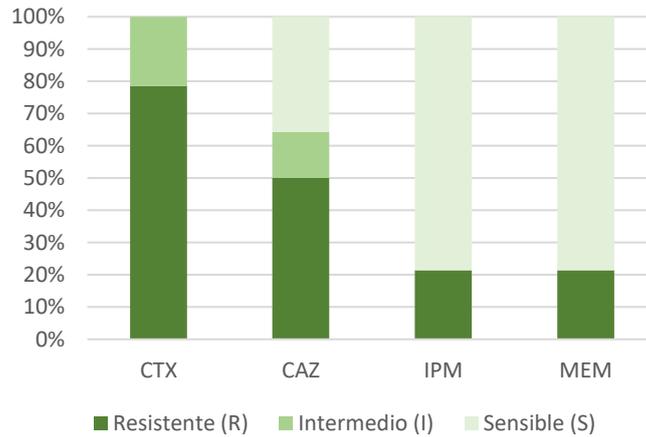


Figura 9. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de espinacas.

En el caso de la Figura 9, se muestran los resultados de las cepas puras aisladas a partir de espinacas, donde se observa claramente la sensibilidad elevada a los antibióticos β -lactámicos de tipo carbapenemes, donde la resistencia a ambos se observa en un 21,4% de las 14 cepas. Por el contrario, en el caso de las cefalosporinas 3G se detecta una resistencia bastante más elevada, destacando la resistencia a cefotaxima, donde ninguno de los cultivos puros llega a ser sensible y una resistencia del 78,6%. Un total de 11 cepas de las 14 presentaron algún perfil de resistencia (78,6%).

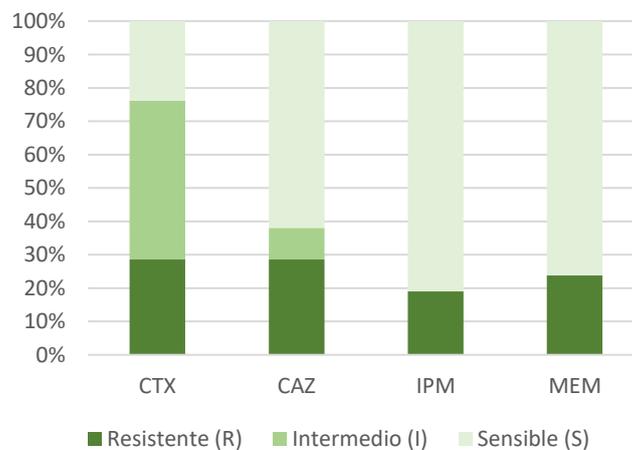


Figura 10. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de lechuga.

Los perfiles de resistencia de las cepas extraídas de muestras de lechuga se muestran en la Figura 10. En ella podemos observar que una gran cantidad de los aislados han resultado ser sensibles para los cuatro antibióticos ensayados, rondando el porcentaje de resistencias siempre inferior a un 30%. No obstante, en el caso de la cefotaxima, el intervalo intermedio de resistencia es bastante extenso, siendo del 47,6%. En este caso se aislaron 21 cepas puras, de las que solamente 9 presentaron algún perfil de resistencia (42,9%).

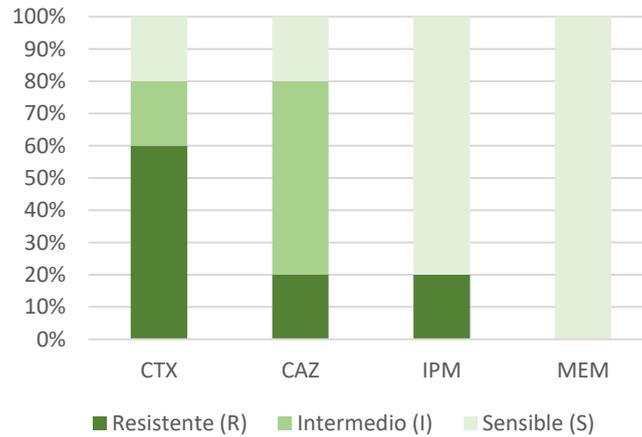


Figura 11. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de col

En el caso de los aislados originarios de col, los perfiles de resistencia son variados, desde una resistencia relativamente alta a CTX (60%), intermedia en el caso de CAZ e IPM (20%) y nula en MEM. Tres de las cepas presentan una sensibilidad intermedia a CAZ (60%). De las cinco colonias axénicas, cuatro presentan alguno de los perfiles de resistencia descritos (80%).

En resumen, se puede observar una tendencia de mayor resistencia al grupo de cefalosporinas en cada uno de los vegetales frente al grupo de los carbapenemes.

4.1.1. Estudio de producción de BLEE en los aislados

En el análisis de los otros dos antibióticos ensayados se puede valorar la presencia o ausencia de β -lactamasas en las cepas aisladas, confirmando así si alguna de ellas presenta BLEE. Esto se estudió mediante el ensayo contrastado de antibióticos con y sin ácido clavulánico, un conocido inhibidor de estas enzimas es por ello que en aquellas cepas donde los halos que presentan una diferencia igual o mayor a 5mm en los antibióticos con clavulanato, se confirma la presencia de algún tipo de BLEE en ellas (Chaudhary y Aggarwal, 2004).

En un 16,3% de los aislados encontramos presencia de BLEE ya que disminuye el efecto del antibiótico. Seguidamente, en un 38,8% hay evidencias en alguno de los dos antibióticos testados, pero principalmente en CTL, en un 36,7%. Finalmente, en 22 de los aislados no hay evidencia de la presencia de estas enzimas, concretamente en un 44,9% de los casos, donde la diferencia entre los halos de los antibióticos no es significativa (Figura 12).

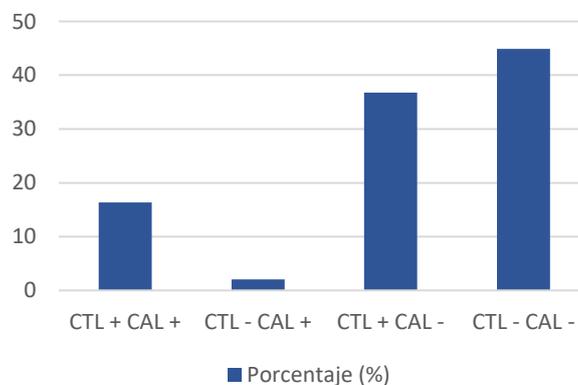


Figura 12. Presencia o ausencia de BLEE en las muestras según los resultados en CTL y CAL.

4.1.2. Comparativa de perfiles de resistencia entre aislados de origen convencional y ecológico

A continuación, se analizarán la disparidad de los perfiles de resistencias entre las muestras de origen convencional y ecológico.

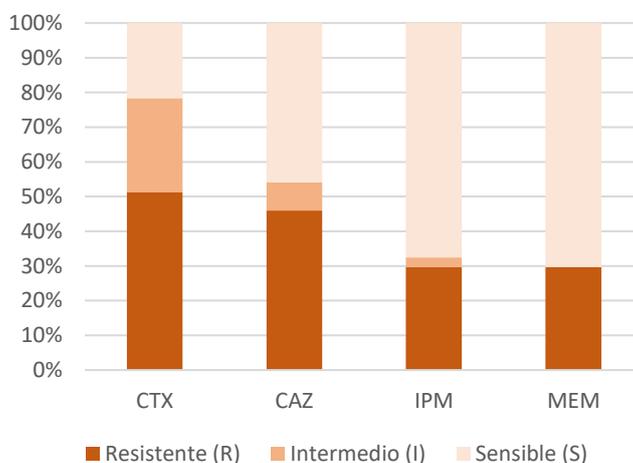


Figura 13. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de origen ecológico.

En la Figura 13 se exponen los porcentajes de resistencias en los aislados de origen ecológico. De las 37 cepas que se han aislado un 51,4% ha resultado resistente a CTX, 46% a CAZ, y un 29,7% a cada uno de los carbapenemes. Al igual que en la conclusión anterior, la sensibilidad es mayor para este último subgrupo de β -lactámicos.

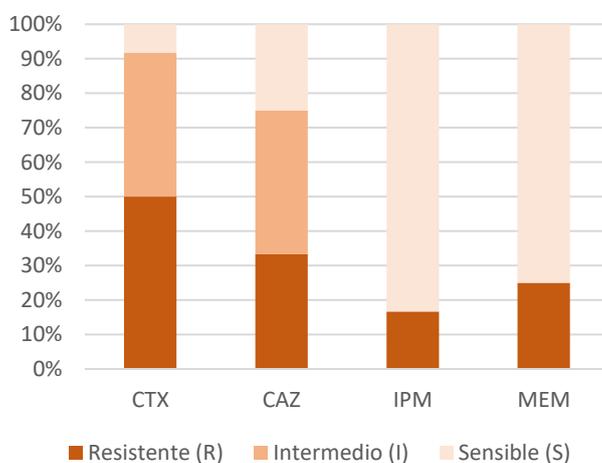


Figura 14. Perfiles de resistencia de los cultivos aislados de origen convencional.

En el caso de los aislados de vegetales convencionales la resistencia a antibióticos carbapenemes es menor, siendo esta visible en un 16,7% en el caso del IPM, y un 25% en el caso de MEM. Asimismo, son ligeramente menores las resistencias a las cefalosporinas, aunque mayor el intervalo intermedio de resistencia en estos, dejando solamente un 8,3% de aislados sensibles a CTX y un 25,2% a CAZ.

En general se observa una resistencia ligeramente mayor en las cepas provenientes de cultivos ecológicos que en el caso de las convencionales, donde destaca la alta resistencia a CTX y CAZ.

4.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS

Dado que es uno de los objetivos del trabajo es identificar aquellas especies que son resistentes a cefalosporinas y carbapenémicos, solamente se han secuenciado los aislados que presentaban algún tipo de perfil de resistencia a dichos antibióticos. Para la correcta identificación de los aislados, se recurrió directamente a la secuenciación del gen 16S rRNA, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5 y en la tabla A del anexo.

Tabla 5. Identificación molecular de las cepas resistentes aisladas.

Nº de cepa	Especie identificada
P36C2, P38C1, P40C3	<i>Pseudomonas sp.</i>
P5C2, P21C1.2	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>
P22C1, P36C2	<i>Pseudomonas guariconensis</i>
P32C1	<i>Pseudomonas putida</i>
P33C1, P36C1	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>
P4C1.1	<i>Sternotrophomonas sp.</i>
P4C1.2, P4C2, P4C3, P5C1, P6PC1, P25C1, P27C1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
P23C1	<i>Stutzerimonas stutzeri</i>
P34C1	<i>Acinetobacter sp.</i>
P37C1	<i>Acinetobacter baumannii</i>
P26C1, P35C1, P35C2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
P10C1, P10C2	<i>Olivibacter jilunii</i>
P13C1	<i>Olivibacter oleidegradans</i>
P12C2, P30C1	<i>Cupriavidus sp.</i>
P17C2	<i>Chelatococcus caeni</i>
P36C3.1	<i>Bacterium</i>

Los resultados muestran una predominancia del género *Pseudomonas* entre los aislados, un total de 19 cepas, es decir, un 63,3% de las cepas totales. Dentro de este género se distinguen ocho especies distintas. Seguidamente encontramos el género *Acinetobacter*, representando un 15.38% del total de los aislados. Tres aislados han sido identificados pertenecientes al género *Olivibacter*, dos al género *Cupriavidus* y uno como *Chelatococcus caeni*.

5. DISCUSIÓN

Los vegetales de origen orgánico se han vuelto cada vez más populares en los últimos años, pero debido a la presencia en ellos de bacterias resistentes a antibióticos, representan una preocupación para la salud pública. Estos productos no solo sirven como reservorio de especies bacterianas resistentes (Ababneh et al., 2022), sino que también tienen la capacidad de propagar los genes de estas resistencias dentro de las poblaciones y el medio ambiente, provocando la aparición de algunas bacterias multirresistentes, es decir, bacterias que manifiestan resistencia por lo menos a tres grupos de antibióticos distintos (Magiorakos et al., 2012). Las enfermedades causadas por estas bacterias son variadas, desde cutáneas hasta infecciones en el tracto urinario o incluso meningitis, destacando como responsables emergentes las bacterias pertenecientes a géneros como *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae* y, de forma oportunista, *Pseudomonas* (Cavalheira, 2017; Córdova, 2022).

Uno de los propósitos de este proyecto es abordar la brecha de conocimiento acerca de los riesgos asociados a la presencia de determinantes de resistencia antibiótica en vegetales ecológicos, y por ello el objetivo ha sido la identificación de especies bacterianas resistentes a antimicrobianos y establecer sus perfiles de resistencias predominantes. Específicamente se han estudiado las bacterias Gram negativas, en especial las productoras de BLEE, ya que representan una proporción significativa de las infecciones causadas por estos microorganismos resistentes a los fármacos en entornos comunitarios y sanitarios (Jiménez-Belenguer et al., 2023).

5.1 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LOS AISLADOS

De las 49 cepas aisladas solamente 7 (lechuga, col y kale) no presentaban ningún indicio de resistencia, es decir, eran totalmente sensibles a los antibióticos ensayados, lo que deja un 85,7% de cepas con presencia de resistencias, aunque algunas sean catalogadas como intermedias.

Respecto a los antibióticos, el que menor resistencia mostró fue el imipenem (IPM), para el que solamente el 24,5% de las muestras fueron resistentes. Por el contrario, tenemos la cefotaxima (CTX) que ha sido el antibiótico con más incidencia de resistencia, encontrándose en 40 de 49 aislados, con más de la mitad de los aislados resistentes (51%) y casi un tercio de resistencia intermedia (30,6%). Seguidamente, con un total de 21 aislados resistentes (42,9%) y 8 con resistencia intermedia (16,3%) se encuentra la ceftazidima (CAZ), por lo tanto, podemos afirmar según el estudio realizado que CAZ presenta menor cantidad de resistencias que CTX, dado que presenta 11 aislados sensibles más que el segundo antibiótico, a pesar de tratarse ambos de cefalosporinas de tercera generación. Por último, cabe destacar el meropenem (MEM), que mientras presenta el mismo porcentaje de aislados sensibles (73,5%) que IPM, el tanto por ciento de los resistentes es ligeramente mayor (26,5%). Estos resultados son comparables a muchos otros como es el caso del estudio de Spangler, Jacobs y Appelbaum (1994), donde declaran que la concentración mínima inhibitoria (MIC) de IPM y MEM es significativamente menor que de CTX pero sobre todo que CAZ; o en el caso de las Gram negativas aisladas en aguas por Akpan et al. (2020), donde se ensaya la acción de varios antibióticos frente a aislados de *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*, que presentan una resistencia relativamente baja comparando con los resultados obtenidos (en el caso de *Pseudomonas*, CTX y CAZ, 16 y 8,3% respectivamente y aún menor en *Enterobacteriaceae* 11,9 y 4,7% respectivamente).

En el caso de comparar según el vegetal analizado, se observa la misma tendencia que cuando los analizamos generalizadamente, la resistencia a cefalosporinas es más común que a los carbapenemes. Cabe destacar que en los casos de la lechuga y el kale se encuentran niveles

relativamente más igualados en el análisis interno, a pesar de ser mayor el porcentaje de aislados resistentes en el caso del kale. Por el contrario, en cuanto a la col y las espinacas, sí que encontramos más disparidad entre los patrones de resistencia entre cefalosporinas y carbapenemes, aunque en el caso de la col, al haberse aislado solamente 5 cepas, sería conveniente aumentar la muestra para una aproximación con mayor representación en futuros trabajos.

Por consiguiente, dado el elevado nivel de resistencias hacia cefalosporinas, de tercera generación, se está restringiendo su uso en varios ámbitos, como en el tratamiento de infecciones en humanos (Rahal, 1998) y animales (Sato et al., 2014), pues la resistencia a cualquiera de las generaciones de estos antibióticos es cada vez más común y propicia la aparición de cepas más patógenas y peligrosas (Zamudio et al., 2022).

Un aspecto a resaltar es que en el medio de enriquecimiento de ATP, que estaba suplementado con vancomicina (VAN) y meropenem (MEM), se esperaría que las cepas aisladas fuesen resistentes a este último durante el ensayo, pero no ha sido así, sino que solo un 26,5% resultaron resistentes. Una de las razones que justifica esta aparente incongruencia es que durante la realización de los antibiogramas la concentración inhibitoria es mayor a la presente en la suplementación de ATP.

5.1.1. Estudio de producción de BLEE en los aislados

Como se ha comentado con anterioridad, se ha detectado la presencia de β -lactamasas de espectro extendido mediante el test de sinergia de doble disco, es decir, en el antibiograma se han incluido discos de CTX y CAZ sin ácido clavulánico, también conocido como amoxicilina, así como estos mismos discos junto con este inhibidor de β -lactamasas (10 μ g).

Como se ha mostrado en la Figura 7, solo hay evidencia que en un 16,3% de los aislados hay producción de estas enzimas. Por el contrario, la mayoría de las cepas no las producen (44,9%), dado que no se ha observado esta diferencia esperada en el diámetro del halo. No obstante, a partir de los datos obtenidos no podemos confirmar que hay o no presentes estas enzimas, pues algunas pueden resultar sensibles a los antibióticos con los que se ha ensayado, es por ello que en un 38,8% de los casos aparecen resistentes a alguno de los dos.

Por todo lo expuesto solamente se puede concluir que 8 de los aislados se consideran productores de BLEE que actúan contra las dos cefalosporinas ensayadas, y todas ellas presentan algún perfil de resistencia, principalmente a las de este tipo de beta lactámicos. De estas 8 cepas, la mayoría corresponde al género *Pseudomonas*, a excepción de las cepas P10C1 y P10C2, correspondientes a *Olivibacter*.

El método empleado descrito como test de sinergia de doble disco, se emplea principalmente para la detección de infecciones presentes en el tracto urinario en animales y humanos, a partir del cual se obtienen los aislados, como es el caso del estudio de Kaur et al. (2013), donde se lleva a cabo la detección de BLEE en bacilos Gram negativos y en donde obtienen una media de productores de BLEE bastante superior a la obtenida, de un 57,4% entre *E. coli* y *K. pneumoniae*, los aislados que se han estudiado en este caso. Por lo que podemos concluir que los aislados de vegetales a diferencia de los clínicos están sometidos a una menor presión antibiótica de carbapenémicos y el riesgo en caso de infección es menor.

Recientemente también se han realizado estudios acerca de la producción de las carbapenemasas, enzimas que inducen la resistencia por hidrólisis de los carbapenemes (Taggar et al., 2020). En este ensayo no se han estudiado, pero en varios artículos queda reflejado el interés por las mismas, como el que llevó a cabo Taggar et al. (2020), donde expone la abundante

presencia y expansión de los genes (CR) que codifican estas enzimas en Enterobacterias presentes en humanos, animales, alimentos y el medio ambiente.

5.1.2. Comparativa de perfiles de resistencia entre aislados de origen convencional y ecológico

Uno de los objetivos principales del presente trabajo es la comparación en cuanto a los perfiles de resistencias que presentan las cepas aisladas de los cultivos de origen convencional y ecológico, y con ello desmentir o confirmar creencias populares y aportar información para próximos proyectos y futuras regulaciones.

En las figuras 12 y 13 se han representado los patrones de resistencia de los aislados de ambos cultivos. Analizando antibiótico por antibiótico, la resistencia a CTX, en primer lugar, es similar en ambos tipos de cultivo. En el caso de CAZ, el porcentaje de resistentes que es notablemente mayor en el caso de las cepas ecológicas que de las convencionales. Si se pone atención a los antibióticos restantes, del grupo de los carbapenemes, se observa en ambos tipos de cultivos una disminución de la proporción de resistentes, aunque es mayor en el caso de los vegetales ecológicos.

En general, los aislados de vegetales ecológicos presentan porcentajes más elevados de resistencia en todos los antibióticos ensayados, aunque en el caso de las dos cefalosporinas, los vegetales de origen convencional presentan un menor porcentaje de cepas puramente sensibles, contemplando el elevado número de aislados con resistencia intermedia.

En principio, los resultados no son totalmente lo esperado, pues la hipótesis era que los aislados convencionales presentasen mayor nivel de resistencia, dado el uso de plaguicidas y otros factores y productos que aceleren la aparición de resistencias en estos cultivos. Por otro lado, al estar ausentes todos estos agentes desencadenantes de resistencias en los cultivos ecológicos, se promueve que se desarrollen en mayor medida las poblaciones bacterianas, como se comprobó en un estudio en los mercados ecológicos en Connecticut (Karumathil et al., 2016); y con ello una expansión de los genes de resistencia entre todas ellas (Ababneh et al., 2022). Además, en estudios como el que llevo a cabo Zhu et al. (2017), se ha demostrado que algunos cultivos orgánicos tienen mayor presencia de genes de resistencia a antibióticos, dado que las principales especies bacterianas que los presentan son originarias del suelo.

Se ha de tener en cuenta que se han analizado menos muestras de cultivo convencional que ecológico, por lo que ha resultado en un menor número de aislados de origen convencional (12, frente a 37 de origen ecológico) y por lo tanto, la representación no es tan ajustada, sería interesante ampliar el muestreo para tener resultados más concluyentes.

5.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS

El género *Pseudomonas* fue el más común, representando el 61.5% de los aislados, y es que este tipo de bacterias Gram negativas son cada vez más comunes y han sido detectadas en ecosistemas muy variados, predominando en aguas y suelos. Estos bacilos son conocidos por ser responsables de patogenia en plantas y animales, pero principalmente, *P. aeruginosa* es de gran interés por este mismo motivo (Silby et al., 2011), siendo considerado un patógeno oportunista en humanos causando infecciones en diversas localizaciones del cuerpo, como por ejemplo piel u oído. Esta especie de bacilo presenta numerosas resistencias intrínsecas a una gran variedad de antibióticos, así como una gran capacidad de adquisición de estas mediante elementos genéticos móviles (Gutiérrez et al., 2017). Por otro lado, destaca el aislamiento de

Stenotrophomonas maltophilia, otro patógeno oportunista emergente que se aisló por primera vez en 1943 y representa más de la mitad de las bacterias pertenecientes al grupo *Pseudomonas* totales aisladas en el presente proyecto a partir de espinacas, kale y lechuga escarola y maravilla. No se trata de una cepa altamente patógena, sin embargo, ha sido asociada a altas mortalidades en infecciones nosocomiales y con altos ritmos de adaptabilidad en lo que respecta a sus mecanismos de defensa (Brooke, 2012).

Cuatro de las cepas aisladas han sido identificadas como parte del género *Acinetobacter* a partir de espinacas, kale (convencional) y col. El hecho de que sea el segundo patógeno más identificado en este trabajo es alarmante dado que algunas cepas de *Acinetobacter*, sobretodo la especie *Acinetobacter baumannii*, son consideradas altamente peligrosas en lo que concierne a la salud humana, pues el rango resistencias que estas presentan está en constante aumento (Rafei et al. 2015; Ababneh et al., 2022).

También fueron identificadas cepas de género *Olivibacter*, *Cupriavidus* y *Chelatococcus*, pero en menor frecuencia que las anteriormente comentadas. En el caso del género *Olivibacter*, al haber sido recientemente establecido de manera oficial como género bacteriano, hay muy poca bibliografía al respecto. Por el contrario, las bacterias del género *Cupriavidus* se han establecido como comunes multirresistentes, cuyo hábitat más común son las aguas, que usan megaplásmidos como método de transmisión horizontales de resistencias (Zhang et al., 2018). Por último, el género *Chelatococcus* en 2015 se declaró sensible a todo tipo de antibióticos β -lactámicos (Egli y Auling, 2015), pero en posteriores estudios se ha aprovechado su capacidad de degradación de antibióticos para eliminar contaminaciones de los mismos, pues a pesar de presentar cierta resistencia a antimicrobianos, es un género poco propenso a generar genes de resistencia (Zhang et al., 2023).

6. CONCLUSIONES

La presencia relativamente elevada de cepas resistentes aisladas de los productos analizados confirma el peligro emergente que supone la aparición de genes de resistencia y la transmisión de los mismos en ámbitos como la agricultura, sobre todo para la medicina y salud humana.

La identificación de los microorganismos mediante la secuenciación del gen 16S rRNA es una forma más precisa de reconocer las cepas detectadas que por otras metodologías de índole bioquímico, por ejemplo.

La mayoría de las cepas aisladas fueron identificadas como *Pseudomonas spp.*, destacando el patógeno emergente *Stenotrophomonas maltophilia*, que se ha clasificado como multiresistente en muchos estudios y su alta presencia indica que el consumo de vegetales crudos puede llegar a ser un riesgo para individuos con un sistema inmune comprometido. Asimismo, destaca el género *Acinetobacter spp.*, que como el anterior, se trata de patógenos oportunistas suponiendo un riesgo en la salud pública.

De los antibióticos que fueron ensayados para evaluar la resistencia a los mismos mediante la técnica disco-placa, se ha detectado un mayor nivel de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación que a los carbapenemes. La cefotaxima ha resultado en todos los casos el antibiótico que más resistencia producía,

La mayoría de las cepas no son productoras de betalactamasas aunque su presencia sea cada vez más común.

Los vegetales de origen orgánico mostraron niveles más elevados de resistencia a los antibióticos que aquellos que se obtuvieron de comercios convencionales, a pesar de que de estos también fueron aisladas varias cepas con resistencias. De esta forma se confirma que independientemente del tipo de cultivo, la amenaza de patógenos resistentes está presente y cada vez más, en todas nuestras vidas.

La resistencia a los antibióticos en las plantas no es solamente un problema que concierne a la agricultura, sino que puede derivar en enfermedades que afecten a humanos, facilitando la transmisión de genes de resistencia entre distintas bacterias, lo que supone una grave amenaza para la salud pública y la eficacia de las terapias y el control de las enfermedades infecciosas.

Por lo tanto, es imperativo establecer un enfoque multidisciplinario que involucre a diferentes sectores para abordar este problema. Es necesario invertir en investigaciones y campañas de concienciación pública, así como establecer regulaciones más estrictas que fomenten métodos más sostenibles y seguros de producción y consumo, y por encima de todo, regulaciones respecto al correcto y consciente uso de los antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

(CAECV). (2020). *Informe del Sector Ecológico de la Comunitat Valenciana*.

(EFSA), E. F. S. A., & (ECDC), E. C. for D. P. and C. (2023). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA Journal*, 21(3), e07867. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7867>

(FAO). (2022). El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2022. In *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2022*. FAO; IFAD; WHO; WFP; UNICEF; <https://doi.org/10.4060/cc0639es>

Ababneh, Q., Al-Rousan, E., & Jaradat, Z. (2022). Fresh produce as a potential vehicle for transmission of *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Food Contamination*, 9(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40550-022-00092-7>

Agència Catalana de Seguretat Alimentària. (2021). *Alimentos ecológicos y convencionales: Seguridad alimentaria y composición nutricional Informe aprobado por el Comité Científico Asesor de Seguridad*.

Ahmed, M. O., & Baptiste, K. E. (2018). Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. In *Microbial Drug Resistance* (Vol. 24, Issue 5, pp. 590–606). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0147>

Akpan, S. N., Odeniyi, O. A., Adebowale, O. O., Alarape, S. A., & Adeyemo, O. K. (2020). Antibiotic resistance profile of Gram-negative bacteria isolated from Lafenwa abattoir effluent and its receiving water (Ogun River) in Abeokuta, Ogun state, Nigeria. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 87(1), e1–e8. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1854>

Alanis, A. J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research*, 36(6), 697–705. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>

Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>

Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>

Baran, A., Kwiatkowska, A., & Potocki, L. (2023). Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 24, Issue 6). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/ijms24065777>

Boyanova, L., Hadzhiyski, P., Gergova, R., & Markovska, R. (2023). Evolution of *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics: A Topic of Increasing Concern. *Antibiotics*, 12(2), 332. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020332>

Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951. <https://doi.org/10.1128/cmr.14.4.933-951.2001>

Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 25, Issue 1, pp. 2–41). <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>

Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>

Carvalho, A., Silva, J., & Teixeira, P. (2017). Lettuce and fruits as a source of multidrug resistant *Acinetobacter* spp. *Food Microbiology*, 64, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.005>

Ceuppens, S., Hessel, C. T., de Quadros Rodrigues, R., Bartz, S., Tondo, E. C., & Uyttendaele, M. (2014). Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 67–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.025>

Chaudhary, U., & Aggarwal, R. (2004). EXTENDED SPECTRUM β -LACTAMASES (ESBL) – AN EMERGING THREAT TO CLINICAL THERAPEUTICS. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 22(2), 75–80. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)02884-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)02884-X)

Comisión Europea (2018). A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf

Córdova, P., Rivera-González, J. P., Rojas-Martínez, V., Villarreal, P., Zamorano, A., Fiore, N., San Martín, D., Vera, F., Gálvez, E., Romero, J., Barrueto, J., Ilabaca-Díaz, C., & Higuera, G. (2022). Antimicrobial Multiresistant Phenotypes of Genetically Diverse *Pseudomonas* spp. Isolates Associated with Tomato Plants in Chilean Orchards. *Horticulturae*, 8(8), 750. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080750>

Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6), 287–292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>

Cycoń, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>

D’Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>

Davies, J. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. In *Microbiology and Molecular Biology Reviews (Vancouver, Canada)* (Vol. 47, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00016-10>

- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160–201. <https://doi.org/10.1128/cmr.00037-09>
- Džidić, S. (2008). *Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects*. <http://www>.
- Egli, T. W., & Auling, G. (2015). Chelatococcus. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–9). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00796>
- Gajdács, M., Urbán, E., Stájer, A., & Baráth, Z. (2021). Antimicrobial resistance in the context of the sustainable development goals: A brief review. *European Journal of Investigation in Health, Psychology and Education*, 11(1), 71–82. <https://doi.org/10.3390/ejihpe11010006>
- Gao, Y.-X., Li, X., Fan, X.-Y., Zhao, J.-R., & Zhang, Z.-X. (2022). Wastewater treatment plants as reservoirs and sources for antibiotic resistance genes: A review on occurrence, transmission and removal. *Journal of Water Process Engineering*, 46, 102539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102539>
- García Rodríguez, J. A., Cantón, R., García Sánchez, E. J., Gómez-Lus, M. L., Martínez Martínez, L., Rodríguez-Avial, C., & Vila, J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica (SEIMC)*.
- Ge, M., Chen, Z., Russell, H., Kohler, J., Silver, L. L., Kerns, R., Fukuzawa, S., Thompson, C., & Kahne, D. (1999). Vancomycin Derivatives That Inhibit Peptidoglycan Biosynthesis Without Binding d-Ala-d-Ala. *Science*, 284(5413), 507–511. <https://doi.org/10.1126/science.284.5413.507>
- Gomiero, T., Pimentel, D., & Paoletti, M. G. (2011). Environmental Impact of Different Agricultural Management Practices: Conventional vs. Organic Agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(1–2), 95–124. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.554355>
- Gutiérrez Cárdenas, O. G., Navarro Ibarra, L. F., Loeza Lara, P. D., del Río Rodríguez, O. G., & Jiménez Mejía, R. (2017). Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola. *Nova Scientia*, 9(19), 97–112. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203353519007>
- Hancock, R. E. W., & Brinkman, F. S. L. (2002). Function of *Pseudomonas* Porins in Uptake and Efflux. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 17–38. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160310>
- Hawkey, P. M. (1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*, 317(7159), 657. <https://doi.org/10.1136/bmj.317.7159.657>
- Heinz, K., & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan .Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. In *BACTERIOLOGICAL REVIEWS* (Vol. 36, Issue 4). <https://journals.asm.org/journal/br>
- Heo, Y.-A. (2021). Imipenem/Cilastatin/Relebactam: A Review in Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*, 81(3), 377–388. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01471-8>
- Higgins, P., Fluit, A., & Schmitz, F.-. (2003). Fluoroquinolones: Structure and Target Sites. *Current Drug Targets*, 4(2), 181–190. <https://doi.org/10.2174/1389450033346920>

- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 51, pp. 72–80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Infante Amate, J., & González De Molina, M. (2013). “Sustainable de-growth” in agriculture and food: An agro-ecological perspective on Spain’s agri-food system (year 2000). *Journal of Cleaner Production*, 38, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.03.018>
- Jaimee, G., & Halami, P. M. (2016). Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid bacteria of food origin—an impending menace. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1137–1151. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7184-y>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 45, Issue 9, pp. 2761–2764). <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jiménez-Belenguer, A. I., Ferrús, M. A., Hernández, M., García-Hernández, J., Moreno, Y., & Castillo, M. Á. (2023). Prevalence and Characterization of Beta-Lactam and Carbapenem-Resistant Bacteria Isolated from Organic Fresh Produce Retailed in Eastern Spain. *Antibiotics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020387>
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), 181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. In *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* (Vol. 33, Issue 3, pp. 300–305). Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Karumathil, D. P., Yin, H.-B., Kollanoor-Johny, A., & Venkitanarayanan, K. (2016). Prevalence of Multidrug-Resistant Bacteria on Fresh Vegetables Collected from Farmers’ Markets in Connecticut. *Journal of Food Protection*, 79(8), 1446–1451. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-548>
- Lampkin, N., Padel, S., & Foster, C. (2000). Organic farming. In *CAP regimes and the European countryside: prospects for integration between agricultural, regional and environmental policies*. (pp. 221–238). CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851993546.0221>
- Li, X., Ma, D., Livermore, D. M., Nikaido, H., & Hall, S. (1994). Mailing address. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. <https://journals.asm.org/journal/aac>
- Li, X., Gu, N., Huang, T. Y., Zhong, F., & Peng, G. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1114199>
- Lipsitch, M., & Samore, M. H. (2002). Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance: A Population Perspective. In *Emerging Infectious Diseases* • (Vol. 8, Issue 4).
- Liu, B., & Pop, M. (2009). ARDB - Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn656>

Loncarevic, S., Johannessen, G. S., & Rorvik, L. M. (2005). Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. *Letters in Applied Microbiology*, 41(2), 186–189. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01730.x>

MacDougall, C. (2017). Penicillins, Cephalosporins, and Other β -Lactam Antibiotics. In L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, & B. C. Knollmann (Eds.), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. McGraw-Hill Education. accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?aid=1162544617

Maffei, D. F., Batalha, E. Y., Landgraf, M., Schaffner, D. W., & Franco, B. D. G. M. (2016). Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 47, pp. 99–105). Elsevier Editora Ltda. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.006>

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

Markley, J. L., & Wencewicz, T. A. (2018). Tetracycline-inactivating enzymes. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01058>

Martin, M. J., Thottathil, S. E., & Newman, T. B. (2015). Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers. *American Journal of Public Health*, 105(12), 2409–2410. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2015.302870>

McInnes, R. S., McCallum, G. E., Lamberte, L. E., & van Schaik, W. (2020). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 53, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.002>

Michael, C. A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M. (2014). The antimicrobial resistance crisis: Causes, consequences, and management. In *Frontiers in Public Health* (Vol. 2, Issue SEP). Frontiers Media S. A. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145>

Ministerio de Agricultura, P. y A. (2022). *Producción ecológica 2021*. <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/produccion->

Moellering, R. C., & et al. (2012). Cephalosporins. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (7th ed.).

Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., & Diez-Gonzalez, F. (2004). Preharvest Evaluation of Coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Organic and Conventional Produce Grown by Minnesota Farmers. *Journal of Food Protection*, 67(5), 894–900. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.5.894>

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2016). *Medical Microbiology*, Elsevier, 8th edition.

Nguz, K., Shindano, J., Samapundo, S., & Huyghebaert, A. (2005). Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. *Food Control*, 16(7), 623–628. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.07.001>

Parlamento Europeo. (2019). Reglamento (UE) 2019/ del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2018, relativo a la fabricación, la comercialización y el uso de piensos medicamentosos, por el que se modifica el Reglamento (CE) n.o 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo y se deroga la Directiva 90/167/CEE del Consejo.

Piddock, L. J. v. (2006). *Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance?* www.nature.com/reviews/micro

Polz, M. F., & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3724–3730. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3724-3730.1998>

Rafei, R., Hamze, M., Pailhoriès, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M. L., Dabboussi, F., & Kempf, M. (2015). Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2359–2367. <https://doi.org/10.1128/AEM.03824-14>

Rahal, J. J. (1998). Class Restriction of Cephalosporin Use to Control Total Cephalosporin Resistance in Nosocomial *Klebsiella*. *JAMA*, 280(14), 1233. <https://doi.org/10.1001/jama.280.14.1233>

Rivas K.B., & Ribas M.A. (2002). Cefalosporinas: De la Primera a la Cuarta Generación. *Revista de la Facultad de Medicina*, 25, 142–153. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04692002000200003&nrm=iso

Ruiz-Roldán, L., Rojo-Bezares, B., Lozano, C., López, M., Chichón, G., Torres, C., & Sáenz, Y. (2021). Occurrence of *Pseudomonas* spp. in Raw Vegetables: Molecular and Phenotypical Analysis of Their Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Traits. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12626. <https://doi.org/10.3390/ijms222312626>

Sato, T., Okubo, T., Usui, M., Yokota, S., Izumiyama, S., & Tamura, Y. (2014). Association of Veterinary Third-Generation Cephalosporin Use with the Risk of Emergence of Extended-Spectrum-Cephalosporin Resistance in *Escherichia coli* from Dairy Cattle in Japan. *PLoS ONE*, 9(4), e96101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096101>

Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*, 8(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. Mohd. D., & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>

Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>

- Soler, N., & Forterre, P. (2020). Vesiduction: the fourth way of HGT. *Environmental Microbiology*, 22(7), 2457–2460. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15056>
- Spangler, S. K., Jacobs, M. R., & Appelbaum, P. C. (1994). Susceptibilities of 177 penicillin-susceptible and -resistant pneumococci to FK 037, cefpirome, cefepime, ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, biapenem, meropenem, and vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(4), 898–900. <https://doi.org/10.1128/aac.38.4.898>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Sumberg, J., & Giller, K. E. (2022). What is ‘conventional’ agriculture? In *Global Food Security* (Vol. 32). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2022.100617>
- Sykes, R. (2010). The 2009 Garrod Lecture: The evolution of antimicrobial resistance: A Darwinian perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 1842–1852. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq217>
- Sykes, J. E., & Papich, M. G. (2014). *Antibacterial Drugs*.
- Szczech, M., Kowalska, B., Smolińska, U., Maciorowski, R., Oskiera, M., & Michalska, A. (2018). Microbial quality of organic and conventional vegetables from Polish farms. *International Journal of Food Microbiology*, 286, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.018>
- Tang, K., & Zhao, H. (2023). Quinolone Antibiotics: Resistance and Therapy. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 16, pp. 811–820). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S401663>
- Tango, C. N., Choi, N.-J., Chung, M.-S., & Oh, D. H. (2014). Bacteriological Quality of Vegetables from Organic and Conventional Production in Different Areas of Korea. *Journal of Food Protection*, 77(8), 1411–1417. <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-514>
- Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina., K., Rivas, M., Dávila, E., & Rodríguez, M. (2002). Revista de la Facultad de Medicina. In *Revista de la Facultad de Medicina* (Vol. 25, Issue 2). Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Comisión de Publicaciones de la Facultad de Medicina. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04692002000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Walsh, C. (2003). *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. Harvard Medical School.
- Xuetong Fan, Brendan A. Niemira, Christopher J. Doona, Florence E. Feeherry, & Robert B. Gravani. (2009). Microbial Safety of Fresh Produce. In *Microbial Safety of Fresh Produce* (pp. i–xvi). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444319347.fmatter>
- Yuan, X., Lv, Z., Zhang, Z., Han, Y., Liu, Z., & Zhang, H. (2023). A Review of Antibiotics, Antibiotic Resistant Bacteria, and Resistance Genes in Aquaculture: Occurrence, Contamination, and Transmission. *Toxics*, 11(5), 420. <https://doi.org/10.3390/toxics11050420>
- Zamudio, R., Boerlin, P., Beyrouthy, R., Madec, J.-Y., Schwarz, S., Mulvey, M. R., Zhanel, G. G., Cormier, A., Chalmers, G., Bonnet, R., Haenni, M., Eichhorn, I., Kaspar, H., Garcia-Fierro, R., Wood, J. L. N., & Mather, A. E. (2022). Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance genes in *Escherichia coli* from Europe and North America. *Nature Communications*, 13(1), 7490. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34970-7>

Zhang, M., Chen, S., Gnegy, M., Ye, C., Lin, W., Lin, H., & Yu, X. (2018). Environmental strains potentially contribute to the proliferation and maintenance of antibiotic resistance in drinking water: A case study of *Cupriavidus metallidurans*. *Science of The Total Environment*, *643*, 819–826. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.013>

Zhang, J., Yue, Z., Ding, C., Zhou, Z., Zhang, T., & Wang, X. (2023). Metagenomic binning analyses of pig manure composting reveal potential antibiotic-degrading bacteria and their risk of antibiotic resistance genes. *Bioresource Technology*, *371*, 128540. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128540>

Zhu, B., Chen, Q., Chen, S., & Zhu, Y. G. (2017). Does organically produced lettuce harbor higher abundance of antibiotic resistance genes than conventionally produced? *Environment International*, *98*, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.001>

Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*, *285*, 117402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>